

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



TESIS DOCTORAL

Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Ruano Aldea

Directores

Francisco Ortega Gómez
Ramón González Rubio

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA I



Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias, por:

Marta Ruano Aldea

Directores de la Tesis Doctoral

Francisco Ortega Gómez

Ramón González Rubio

Catedráticos de la Universidad Complutense de Madrid

Contenido

Agradecimientos	11
1 Introducción y objetivos	15
1.1 Introducción general	16
1.2 Los lípidos.....	18
1.3 Liposomas o vesículas	21
1.3.1 Fenómenos de Agregación	22
1.3.2 Estabilidad coloidal según la teoría DLVO	35
1.3.3 Clasificación de liposomas	40
1.3.4 Técnicas de obtención de liposomas	42
1.3.5 Aplicaciones de los liposomas	45
1.3.6 Liposomas cargados.....	48
1.4 Microgeles.....	49
1.4.1 Geles sensibles a la temperatura	51
1.4.2 Geles sensibles al pH.....	56
1.5 Polielectrolitos	57
1.5.1 Complejos de polielectrolitos	60
1.5.2 Capas de polielectrolitos. Sobrecompensación de cargas	62
1.5.3 Técnica capa a capa (LbL)	64
1.5.4 Polielectrolitos funcionalizados	67
1.6 Introducción a las células artificiales	70
1.6.1 Híbridos con compartimentos poliméricos y liposomas	73
1.7 Objetivos de la Tesis	75
2 Técnicas experimentales	79
2.1 Técnicas dispersivas	80
2.1.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)	80
2.1.2 Dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS)	90

2.1.3	Dispersión de neutrones de bajo ángulo (SANS)	97
2.1.4	Citometría de flujo	101
2.2	Potencial Zeta.....	103
2.2.1	Fundamentos	103
2.2.2	Instrumentación	107
2.2.3	Metodología	108
2.3	Fluorimetría o Espectrofotometría de fluorescencia	110
2.3.1	Fundamentos	110
2.3.2	Instrumentación	113
2.4	Técnicas de microscopía óptica.....	114
2.4.1	Microscopía de contraste interferencial (DIC).....	114
2.4.2	Microscopía confocal (CLSM).....	116
2.5	Técnicas de microscopía electrónica e iónica	117
2.5.1	Microscopía de transmisión	118
2.5.2	Crio-microscopía electrónica de transmisión.....	120
2.5.3	Crio-microscopía electrónica de barrido	122
2.6	Técnicas de superficie	126
2.6.1	Balanza de cuarzo	126
2.6.2	Elipsometría	130
3	Materiales y métodos	135
3.1	Materiales.....	136
3.1.1	Fosfolípidos.....	136
3.1.2	Tensioactivos	138
3.1.3	Polímeros y microgeles.....	138
3.1.4	Sondas fluorescentes	142
3.1.5	Productos encapsulados	143
3.1.6	Entrecruzadores	144
3.1.7	Otros materiales	146

3.1.8	Disoluciones tampón	148
3.2	Metodología	148
3.2.1	Preparación de los liposomas por extrusión.....	148
3.2.2	Determinación de la concentración de fósforo.....	152
3.2.3	Síntesis de microgeles	154
3.2.4	Síntesis del polímero funcionalizado con grupos -SH.....	156
3.2.5	Síntesis de nanocápsulas poliméricas	157
3.2.6	Técnica capa a capa sobre sustratos esféricos.....	158
3.2.7	Funcionalización de los liposomas. Ensayo cuantitativo	163
4	Resultados y discusión.....	167
4.1	Estudio del recubrimiento de Liposomas	168
4.1.1	Liposomas	168
4.1.2	Estudios en sustratos planos	234
4.1.3	Ensayos de liberación para los sistemas formados	250
4.2	Microgeles.....	253
4.2.1	Variación del tamaño con la temperatura y pH.....	254
4.2.2	Recubrimiento capa a capa con polielectrolitos	257
4.2.3	Variación de la Movilidad electroforética con T	265
4.2.4	Estabilidad del microgel	269
4.3	Híbridos	272
4.3.1	Citometría de Flujo.....	274
4.3.2	Microscopía óptica: Confocal y de contraste	282
4.3.3	Microscopía electrónica de transmisión	285
4.3.4	Ensayos de liberación	286
5	Conclusiones	295
6	Conclusions	301
7	Summary	307
8	Bibliografía	311

9 Anexos 337

9.1 Abreviaturas 338

9.2 Listado de figuras 340

9.3 Listado de tablas 357

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo en el Departamento de Química- Física I en la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de Dr. Francisco Ortega Gómez y Ramón Gonzalez Rubio.

A Francisco Ortega y Ramón Gonzalez por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, su infinita paciencia, comprensión, motivación, trabajo en mi formación y en esta tesis. Ha sido una grata oportunidad el poder trabajar con ellos y compartir su inestimable dedicación dándome una considerable libertad para encontrar mi propio camino en el proceso de esta investigación.

Agradezco la labor formativa de la **Universidad Complutense de Madrid** y las facilidades otorgadas durante el desarrollo del presente trabajo. Al Ministerio de Ciencia e Innovación, por el apoyo económico, otorgado durante el desarrollo de mis estudios de doctorado.

Mi sincera gratitud a los miembros del tribunal por el tiempo que dedicaron durante la revisión de la tesis, con aportaciones valiosas para la mejora del trabajo.

A mis padres y hermanas que con mucha paciencia y cariño han sabido estar conmigo a pesar de la distancia. Son el mejor apoyo y me siento bien al pensar que es un orgullo para ellos. Aunque mis sobrinos no lo sepan, Alazne y Ainar por ser muy pequeños por los ratos que he estado con ellos, pocos pero demasiado intensos y que intentaré que sean más momentos.

Oscar Llorca por la toma de fotografía de crio-TEM, Christian Santeufemio por ser mi amigo y sus sabios consejos sobre CrioSEM, Dr Atta por la aportación de ideas.

A Hernán por darme la oportunidad de visitar instalaciones de neutrones europeas y aprender tanto, al ILL e ISIS por permitir acceder a sus instalaciones.

A John Erick Wong por ser mi amigo al mismo tiempo que responsable de mi estancia y a Walter Richtering por su hospitalidad durante cuatro meses disfrutando de sus instalaciones y aprender sobre los microgeles. A todos los amigos que dejé en Aachen, Tinting, Christine, Minerva. Thomas Eckert (RWTH Aachen University, Aachen, Alemania) por las medidas de SAXS y las discusiones de los resultados.

A Frank Caruso por darme la oportunidad de conocer su trabajo de cerca y poder compartir momentos agradables con su equipo Hannah, Marloes, Angus, Damien, James, Catalina. A todos mis amigos de Melbourne que me ayudaron y nunca me sentí sola, en especial a Anahi, Huang Zhang-Jin, Mick, Lana.

A Bridgette Boudlhal por hacerme sentir parte de su equipo, a Tatiya, mi alma gemela por ser mi amiga y compañera de trabajo y con ella a toda la comunidad tailandesa afincada en Boston.

A Cristina, Sandra, Dani, Sonia e Inés por su colaboración y por la gran ayuda durante el desarrollo de la tesis.

A mis amigos de *patines*, Mariano, Mónica, Pablo, Nacho, Mariajo, Almudena, Antonio, Bene....por ser lo mejor de Madrid y sobre todo por tantos ratos buenos en las rutas X, incontables momentos que han envuelto este periodo de investigación. Por ese apoyo incondicional de Pedro, Fer y Laura.

A toda la gente del departamento que siempre se ha portado genial conmigo. Gracias a Laura, Armando, Edu, Mario, Lauri, David y Alberto por compartir buenos momentos en los comienzos y sobre todo su comprensión. He tenido suerte también de conocer a Lara, gracias por llenar el departamento de alegría, desde siempre fuiste una amiga, una buena amiga. A Jacobo, Sara, Maria-José, Ana, Mac, Ruddi, Silvia, Edu, Mónica y al resto de mi grupo, Grupo de Sistemas Complejos (GSC) por compartir el buen ambiente en esas jornadas de primavera que fueron toda una experiencia y todo lo que unieron, así el departamento es más cercano para todos.

A Alma, Hezzi, Bea, Nubia, Fernando y Elisa por tantos momentos buenos, ayuda incondicional, siempre con una sonrisa en la boca, inventando palabras, aprendiendo nuevas, conociendo lugares y conociendo un poquito más de cada uno, en definitiva forjando una amistad día a día.

Al CAI de Infrarrojos donde he realizado prácticamente toda la investigación, a Jose, un apoyo incondicional y un verdadero amigo y de nuevo a Bea, gran ayuda, contrincante del pádel e insustituible amiga.

¡Gracias a todos por dejar que formara parte de vuestras vidas!

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La ciencia ha vivido en las dos últimas décadas una nueva revolución, el paradigma “nano”, representado por dos nuevas disciplinas denominadas nanociencia y nanotecnología. Éstas están basadas en el desarrollo de métodos de fabricación precisos, reproducibles, y de bajo coste para la obtención de estructuras cada vez más pequeñas, que abarcan desde la escala de la micra hasta la nanométrica y que se aplican en una variedad de sectores industriales, tales como comunicaciones, energía, agua, médico-sanitario, etc^[32].

En medicina y ciencias de la salud, en particular, el desarrollo de sistemas para terapia y diagnosis, la liberación de fármacos o la ingeniería de tejidos, biosensores, ha sido objeto de enorme interés y las investigaciones en estos campos han crecido enormemente en los últimos años. Por ejemplo, se ha aplicado la nanotecnología a la biotecnología^[32-36] dando lugar a la nanobiotecnología, donde se engloba el estudio de biotransportadores para liberación controlada de fármacos, para optimizar su biocompatibilidad^[37] cuando entra en contacto con tejido celular, parte de su composición ha de tener algunos de los componentes celulares, como es el caso de los fosfolípidos que forman parte de los liposomas^[33], que han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo humano^[38-40]. La principal limitación que se ha encontrado hasta ahora es su comportamiento en el medio gastrointestinal, que limita su uso por vía oral, y por ello las nuevas investigaciones se centran en introducir alguna modificación en la estructura del liposoma, como puede ser el recubrimiento de su superficie con un polímero adecuado para superar esta limitación. Este tipo de materiales se han formado basándose en una técnica sencilla y a la vez versátil propuesta por Hong y Decher^[41], que se denomina Ensamblaje Secuencial Electroestático de polielectrolitos (ELL), o crecimiento capa a capa (LbL).

Las nanocápsulas pueden también construirse utilizando una partícula coloidal como plantilla para un recubrimiento por el método LbL. Estos materiales denominados de tipo núcleo-capas (core-shell) presentan propiedades diferentes de las de la partícula plantilla que forma el interior (core) ya que tras modificar la composición superficial se produce una mayor estabilidad y variación de las propiedades físico-químicas^[42]. Con frecuencia, las moléculas que se desea encapsular se mezclan con los

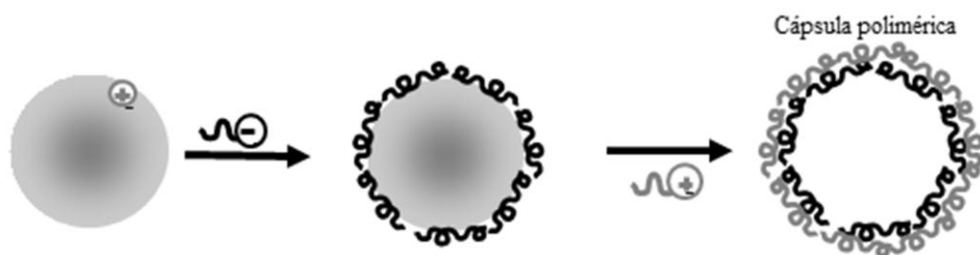


Figura 1.1 Formación de materiales *core-shell* y microcápsulas por ensamblaje electrostático capa a capa de polielectrolitos^[29, 30]. Una partícula de sílice es recubierta por interacciones electrostáticas con polielectrolitos y posteriormente se elimina la partícula plantilla dando lugar a una cápsula polimérica.

precursores de las partículas coloidales durante el proceso de síntesis. Para su caracterización se han llevado a cabo estudios exhaustivos, con un gran número de técnicas experimentales, principalmente espectroscópicas de dispersión (luz, rayos X, neutrones) y electrocinéticas (potencial zeta). De esta forma ha sido posible conseguir sistemas bien caracterizados y aptos para ser utilizados en los procesos de encapsulación.

La liberación del principio activo encapsulado se realiza por difusión a través de la pared exterior^[43] en el caso de las cápsulas poliméricas, y en el caso de liposomas por destrucción de la membrana utilizando concentraciones altas de iones divalentes como el calcio, tensioactivos, cambio de pH o de temperatura^[44-47]. Los liposomas suelen utilizarse para el encapsulamiento de sustancias activas solubles en agua y en particular se han utilizado frecuentemente para la encapsulación de sistemas enzimáticos^[31].

Antes de comenzar con los objetivos que se persiguen en esta tesis, se llevará a cabo una revisión de los fundamentos del comportamiento de los materiales usados y de los procesos de agregación espontánea en los que se basa el trabajo realizado.

1.2 LOS LÍPIDOS

En general, los lípidos son tensioactivos con una o varias cadenas hidrocarbonadas (en algún caso formando ciclos fusionados), que presentan como el resto de tensioactivos uno o varios grupos polares o iónicos en un extremo de la molécula. Comúnmente son liposolubles, es decir solubles en disolventes orgánicos tales como cloroformo/metano^[48]. Aunque existen lípidos sintéticos, el término lípido se refiere, habitualmente, a un conjunto amplio de productos naturales que incluyen grasas, ceras, esteroides, vitaminas lipo-solubles (A, D, E y K) y mono-, di- y triglicéridos, entre otros. Las funciones biológicas más importantes de los lípidos son, entre otras, almacenamiento de energía, componentes de las membranas celulares y moléculas de señalización.

Los lípidos se clasifican, en función de la presencia o no de alguna insaturación en la cadena hidrocarbonada, como insaturados o saturados y, en función de su reactividad con las bases fuertes, los lípidos pueden ser de dos tipos: saponificables (pueden ser hidrolizados por grupos $-OH$ y dar

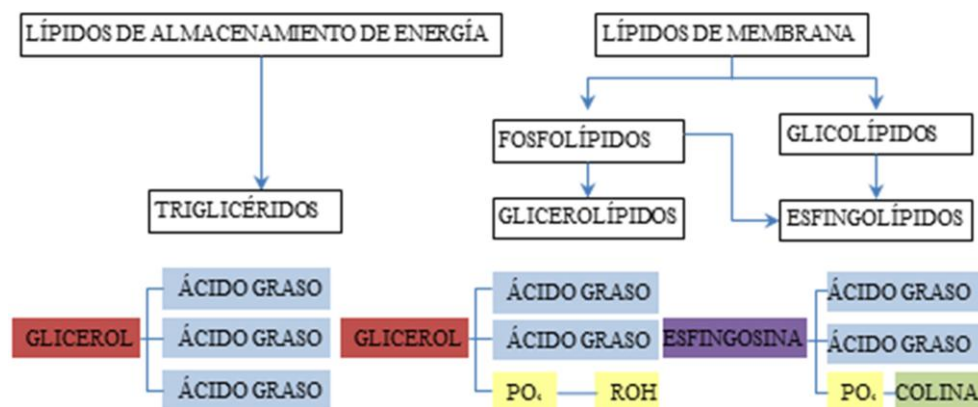


Figura 1.2 Clasificación estructural de los lípidos^[3]. Se distinguen lípidos de almacenamiento de energía como los triglicéridos y los lípidos de membrana como los fosfolípidos y glicolípidos.

lugar a jabones o sales de los ácidos grasos) y no saponificable. Ejemplos de no-saponificables son las vitaminas A y E, y el colesterol. Lípidos saponificables son los triglicéridos, glicerofosfolípidos y los esfingolípidos, que contienen cadenas largas de ácido carboxílico, o ácidos grasos que esterifican una molécula ya sea el glicerol o la esfingosina^[48, 49].

La clasificación se resume en la Figura 1.2. Los fosfolípidos, o diacilfosfoglicéridos son ésteres de glicerol con ácidos grasos ($R\text{-COOH}$, donde R es una cadena hidrocarbonada muy variada) en los que una molécula de glicerol sin carga, se une a dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y a un grupo fosfato. El fosfato se une mediante un enlace fosfodiéster a otro grupo de átomos, que generalmente contienen nitrógeno, como colina denominándose fosfatidilcolina.

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas cuya parte hidrófoba (repele al agua) está constituida por las cadenas hidrocarbonadas de carácter neutro y el componente hidrófilo (afín al agua) es la cabeza del fosfolípido que posee carga eléctrica, como se puede observar en la Figura 1.3.

Todas las membranas plasmáticas activas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos, gracias a su propia autoasociación, con la cabeza polar hacia el exterior de la superficie interaccionando con el agua y sus colas dirigidas hacia el interior, juntándose unas a otras. Por tanto, esta bicapa es una estructura cooperativa que se mantiene unida por

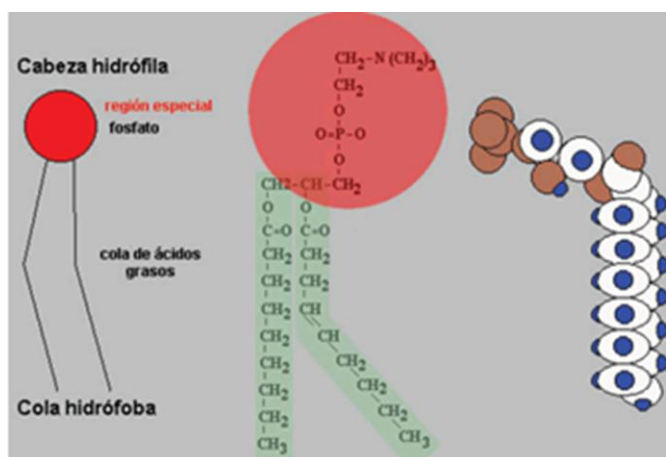


Figura 1.3 Estructura típica de la fosfocolina formada por una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba.

interacciones no covalentes que la refuerzan.

Los fosfolípidos, al igual que todas las moléculas de carácter anfifílico pueden clasificarse según la cabeza polar como aniónicos (cabeza polar negativa), catiónicos (cabeza polar positiva), zwitteriónicos y no iónicos (cabeza polar sin carga). Es la cabeza polar del fosfolípido la que proporciona el valor de la carga al agregado formado^[50]. La longitud y grado de insaturación (enlaces dobles existentes en las cadenas) presente en la cadena hidrocarbonada es un factor importante. Estos dos parámetros van a marcar la flexibilidad de la membrana.^{[51] [52]} Se da mayor rigidez en fosfolípidos de cadena larga y esta rigidez aumenta con el número de insaturaciones.^[53, 54]

La estabilidad de los lípidos se ve afectada por varias reacciones químicas que se pueden producir en disolución. Esterificación y saponificación por un lado, y degradación hidrolítica^[55] por otro. En la esterificación, un ácido graso se une a un alcohol mediante un enlace covalente liberando agua y en la saponificación o hidrólisis alcalina, el ácido graso se une a una base para dar lugar una sal de ácido graso o jabón liberando agua^[51, 56]. La hidrólisis depende de varios factores como el pH, temperatura, tipo de tampón, fuerza iónica longitud de la cadena hidrocarbonada y tipo de cabeza polar, por ello existen varias recomendaciones para que se mantengan estables como son el almacenamiento de la bicapa lipídica en estado criogenizado tras la liofilización^[57] y/o la mezcla de lípidos con colesterol o carbohidratos^[58, 59].

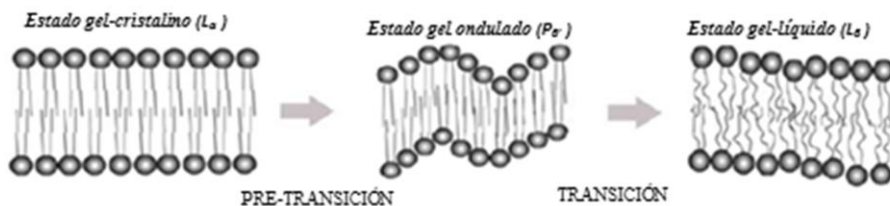


Figura 1.4 Fases del lípido en función de la temperatura. El cambio de fase se debe a un desorden de las cadenas hidrocarbonadas que forman parte de los lípidos debido a un cambio de temperatura^[25, 26].

Los lípidos poseen diferentes fases lipídicas^[55] cuya presencia dependerá de la estructura del lípido, del tipo de disolvente y de la temperatura de trabajo^[60], tal como se puede apreciar en la Figura 1.4^[61-63]. Las fases identificadas en la Figura 1.4 son L_β (fase de gel lamelar), P_β (fase intermedia denominada *ripple gel phase*) y L_α ^[51, 64] (fase de líquido cristalino lamelar).

Desde el punto de vista del comportamiento térmico los fosfolípidos pueden encontrarse en forma gel (alta temperatura) o en forma cristalina (baja temperatura). La temperatura que marca el paso de una fase a otra se denomina temperatura de transición, T_m , y es característica de cada lípido puesto que depende directamente del tamaño de la/s cadena/s, presencia de insaturaciones y de la naturaleza de la cabeza polar. Así, cuanto mayor es la longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor es la energía necesaria para realizar el cambio de fase, y por tanto la temperatura de transición es mayor^[65] y por otro lado la presencia de dobles enlaces^[66], en la cadena, aumenta la dificultad de empaquetamiento y disminuye, por tanto, la temperatura de transición.

Desde el punto de vista de la preparación de liposomas, hay que tener en cuenta que la composición lipídica determinará la facilidad de formación y el tipo de liposoma formado. La elección de un lípido o mezcla de lípidos debe realizarse en base al conocimiento de sus propiedades y en función de la aplicación que se quiera dar al liposoma^[3].

1.3 LIPOSOMAS O VESÍCULAS

Los liposomas se descubrieron en 1961 por Bangham^[67-69] y colaboradores quienes observaron que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en disolución acuosa. Estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso. Comúnmente, a las vesículas formadas por fosfolípidos se denominan liposomas, y las que están formadas por lípidos son las vesículas, pero ambas denominaciones para los

liposomas son aceptadas. Por ello en esta tesis, vesícula y liposoma se utilizarán como sinónimo.

Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol^[70], tocoferol, sondas fluorescentes u otros materiales, introducidos en la bicapa lipídica con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular como puede ser carga superficial, reducir la permeabilidad de la membrana o incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa.

Las vesículas formadas por fosfolípidos son usadas como modelo para estudiar el comportamiento de membranas biológicas, debido a que muestran similitudes como pueden ser su estructura, composición, selectividad y permeabilidad selectiva^[71]. En los años 70, Gregoriadis^[72] inició el estudio sobre el potencial que presentan estos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas.

La ampliación de las aplicaciones en las que se utilizan liposomas es debido a que son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfifílico. Además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Por último, si se utilizan lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos^[73, 74] u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo tumores, acercándose al concepto que Helrich^[75] introdujo denominándolo bala mágica.

1.3.1 Fenómenos de Agregación

Las moléculas “anfifílicas” como los tensioactivos convencionales, lípidos y determinados copolímeros de bloque, poseen una característica estructural: una parte de la molécula (polar o iónica) tiene afinidad por el agua, mientras que la otra parte de la molécula (apolar) es insoluble, siente repulsión, por el agua. Esta esquizofrenia molecular es la responsable del fenómeno de autoasociación de estas moléculas en agua (aunque también ocurre en otros disolventes) dando lugar a una multitud de estructuras organizadas, en las que la energía libre del sistema adopta un valor mínimo.

En gran medida detrás de este fenómeno de autoasociación están las peculiares propiedades del agua como disolvente. Uno de los modelos mecano-estadísticos más sencillos que describen la mezcla de líquidos o la disolución, es el modelo de disoluciones regulares, en este modelo la energía libre de mezcla se compone de la suma de dos términos: uno que procede de la ganancia en entropía configuracional del estado mezcla y el otro que procede de la energía de mezcla, y que generalmente se trata a través de una interacción par entre vecinos. En principio, en el caso de disoluciones en agua, la división entre un término de entropía configuracional y uno de energía de interacción es también válido, sin embargo, el término de interacción es mucho más complicado que una interacción par directa entre vecinos. La interacción molecular entre el agua y moléculas de tipo hidrocarburo (cadenas apolares de las moléculas “anfifílicas”) genéricamente denominadas como “aceites” es tan específica e importante que se le ha dado el nombre de interacción o efecto hidrofóbico.

La interacción hidrofóbica tiene una importante componente entrópica, distinta de la entropía de mezcla. Así, aproximadamente el 80% del cambio de energía libre, asociado a la solubilización de una molécula de hidrocarburo en agua se debe a una disminución entrópica. Esta disminución tiene su origen en la red de enlaces de hidrógeno que constituyen la estructura del agua líquida. Si se inserta en esta estructura, una molécula incapaz de formar enlaces de hidrógeno (hidrocarburo), la red de agua se reordena para maximizar el número de enlaces de hidrógeno, restringiendo el número de configuraciones accesibles a las moléculas de agua en las cercanías del soluto, disminuyendo entrópicamente. Es decir, las moléculas de soluto fuerzan a las moléculas de agua cercanas a adoptar un estado más ordenado, tratando de maximizar la formación de enlaces de hidrógeno. Esta interacción hidrofóbica es la responsable última de la insolubilidad de un hidrocarburo en agua, lo que da lugar a una separación de fases cuando estos dos componentes se mezclan. Sin embargo, es posible que esta separación de fases este limitada a una micro-separación de fases, dando lugar a la formación de agregados microscópicos (micelas) termodinámicamente estables. Consideremos la diferencia entre micro- y macro-separación de fases en un modelo sencillo, tomemos una disolución donde el soluto está con una fracción en volumen, ϕ , y donde X_N es la fracción en volumen de soluto presente en agregados de N moléculas. Obviamente la suma sobre todos los posible agregados conduce a la fracción en volumen total, $\sum_N X_N = \phi$. La condición de equilibrio implica que el potencial químico, μ ,

de las moléculas de soluto sea el mismo independientemente del entorno en que se encuentren y por tanto

$$\mu = \varepsilon_N + \frac{k_B T}{N} \log \frac{X_N}{N} \quad (1.1)$$

En esta expresión ε_N es la energía libre asociada al paso de la molécula de soluto de un estado puro a un agregado de N moléculas en disolución y el segundo término da cuenta de la entropía traslacional de agregado, por tanto cuanto mayor es el número de agregación menor es esta contribución. Reagrupando la ecuación anterior podemos despejar X_N

$$X_N = N \exp \left(\frac{N(\mu - \varepsilon_N)}{k_B T} \right) \quad (1.2)$$

Podemos eliminar μ particularizando la expresión para $N=1$, de tal forma que obtenemos la siguiente ecuación que expresa la fracción en volumen de soluto en un agregado de tamaño N en términos de la fracción libre de soluto, X_1 ,

$$X_N = N \left[X_1 \exp \left(\frac{(\varepsilon_1 - \varepsilon_N)}{k_B T} \right) \right]^N \quad (1.3)$$

De esta ecuación se deduce que si $\varepsilon_N \geq \varepsilon_1$ la mayor parte de las moléculas de soluto estarán en disolución en estado monomérico, mientras que si $\varepsilon_N < \varepsilon_1$ se formarán agregados. La forma específica en que ε_N dependa de N determinará que los agregados sean de tamaño finito o infinito (separación de fases).

Para ilustrar este último punto consideremos una mezcla de fluidos, un agregado esférico con N moléculas de uno de los fluidos (soluto) tendrá un radio $r = (3Nv / 4\pi N_A)^{1/3}$, donde v es el volumen molar y N_A el número de Avogadro. Este agregado esférico tendrá asociada una energía interfacial $4\pi r^2 \gamma$, donde γ es la tensión interfacial y por tanto podemos escribir ε_N en función de ε_∞ como

$$\varepsilon_N = \varepsilon_\infty + \frac{4\pi}{N} \left(\frac{3Nv}{N_A 4\pi} \right)^{2/3} = \varepsilon_\infty + \frac{\alpha k_B T}{N^{1/3}} \quad (1.4)$$

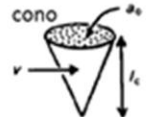






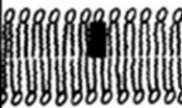

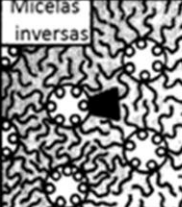
donde $\alpha k_B T = 4\pi\gamma(3v/4\pi N_A)^{2/3}$. Utilizando esta expresión de ε_N en 1.3 obtenemos

$$\begin{aligned} X_N &= N \left\{ X_1 \exp \left[\alpha \left(1 - \frac{1}{N^{1/3}} \right) \right] \right\}^N \\ &\approx N [X_1 \exp(\alpha)]^N \end{aligned} \quad (1.5)$$

Este resultado implica que si X_1 adopta un valor pequeño, de tal forma que $X_1 \exp(\alpha) < 1$, se formarán muy pocos agregados y cuando X_1 se aproxime a $\exp(-\alpha)$, puesto que las fracciones X_N deben ser inferiores a la unidad, todo soluto adicional que se añada debe agregarse. En este ejemplo ε_N es una función monótona decreciente en N y por tanto el tamaño efectivo del agregado que se formará será infinito (separación de fases), habrá por tanto una fracción en volumen crítica, ϕ_c , a partir de la cual las moléculas de soluto aisladas coexistirán con un agregado infinito. Esto que no refleja la solubilidad del soluto en algunas ocasiones se denomina como concentración de agregación crítica o CAC.

La situación anteriormente descrita, no es la habitual para moléculas “anfífilas” para las que ε_N adopta un valor mínimo para un determinado valor finito de N , y los agregados formados en este caso, denominados genéricamente como micelas, aparecen a una fracción en volumen crítica denominada, concentración micelar crítica o CMC. Estos fenómenos de agregación de moléculas “anfífilas” conducen no solo a las estructuras más sencillas como son las micelas esféricas^[76], sino a toda una serie de estructuras como son las micelas cilíndricas, bicapas, vesículas, micelas inversas, en el caso de tensioactivos convencionales y lípidos (ver Tabla 1.1) y algunas más en el caso de tensioactivos no convencionales (ver esquema). Los jabones y tensioactivos sintéticos, tiene comúnmente una cadena hidrocarbonada unida al grupo de cabeza, polar o iónico, sin embargo existen tensioactivos con dos cadenas hidrocarbonadas, entre los que destacan los fosfolípidos. A pesar de la gran variedad de estructuras químicas de las moléculas “anfífilas” su comportamiento respecto a la agregación puede ser racionalizado en términos simples, a partir de unos pocos parámetros geométricos, siguiendo las ideas de Israelachvili^[54]. El proceso de autoensamblado viene fundamentalmente dirigido por la necesidad de minimizar la energía libre del sistema minimizando el contacto entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo con el agua, mientras se

Tabla 1.1 Geometría de los agregados frente al parámetro de empaquetamiento P_c .

Lípido	P_c	Forma	Estructura
Cadenas simples de lípidos (surfactantes) con grupo de cabezas grandes: SDS en baja fuerza iónica	$< 1/3$	cono 	Micela esférica 
Cadenas simples de lípidos con grupo de cabezas pequeñas SDS y CTAB en alta fuerza iónica, lípidos no iónicos.	$1/3-1/2$	Cono truncado 	Micela cilíndrica 
Cadenas dobles de lípidos con grupo de cabezas grandes, cadenas fluidas: Fosfatilcolina (lecitina), fosfatilserina, fosfatilglicerol, fosfatilinositol, ácido fosfatídico,, esfingomelina, fosfato dihexecil, sales dialquil dimetil amonio.	$1/2-1$	Cono truncado 	Bicapas flexibles, vesículas 
Cadenas dobles de lípidos con cabezas pequeñas, lípido aniónico (alta fuerza iónica). Fosfatiletanolamina y fosfatilserina + Ca^{2+}	~ 1	Cilindro 	Bicapas planas 
Cadenas dobles con cabezas pequeñas, lípido aniónico, cadenas poli-insaturadas (cis) alta T. Fosfatiletanolamina-insaturada, cardiolipina + Ca^{2+} , ácido fosfatídico, colesterol y fosfatilserina + Ca^{2+}	> 1	Cono truncado invertido (cuña) 	Micelas inversas 

mantiene el contacto entre los grupos cabeza polar o iónico con el agua. Es este balance, entre mantener alejadas del agua las cadenas y los grupos polares o iónicos cerca del agua lo que conduce a un mínimo de ϵ_N para un determinado valor de N . El parámetro de empaquetamiento P_c , está relacionado con los factores geométricos que a continuación se describen, así:

$$P_c = v / (a_0 \times l_c) \quad (1.6)$$

Los argumentos geométricos anteriormente citados se basan en tres parámetros: área óptima del grupo de cabeza a_0 , longitud crítica de la cadena l_c y volumen de la cadena o cadenas hidrocarbonadas v ^[77, 78]. El último es simplemente el volumen de la parte apolar de la molécula, mientras que l_c esta relacionada con la longitud de la cadena en una configuración completamente extendida.

En la Tabla 1.1 adaptada del libro de Israelachvili^[78] se recogen las condiciones que dan lugar a la formación de las distintas geometrías de los agregados.

La idea de área óptima del grupo de cabeza se ilustra en la Figura 1.5. Si a_0 es pequeño los grupos de cabeza coexisten en un área pequeña con la consiguiente repulsión electrostática o de otro tipo, que conduce a un aumento en la energía libre. Por otro lado, si a_0 es grande las cadenas hidrocarbonadas entran en contacto con el agua con el consiguiente aumento de la energía libre interfacial. Entre estos dos límites se encuentra el valor de a_0 óptimo. Debe tenerse en cuenta que este argumento no es solamente geométrico, puesto que procede del balance entre interacciones repulsivas y atractivas, de hecho si se modifica el alcance de esta interacciones (p.e. apantallando las interacciones electrostáticas con un aumento de la fuerza iónica) el valor de a_0 se ve modificado.

Si la geometría de empaquetamiento de un tensioactivo favorece la formación de un agregado esférico (micela), es decir cuando el parámetro de

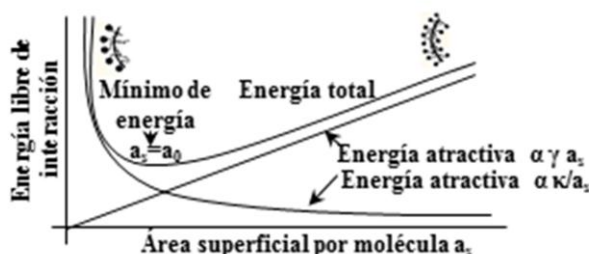


Figura 1.5 Determinación del área óptimo de las cabezas polares, a_0 , mediante el balance entre las fuerzas interfaciales atractivas y las fuerzas repulsivas entre las cabezas polares.

empaquetamiento cumple, $v/l_c a_0 \leq 1/3$, \mathcal{E}_N tendrá un mínimo para un determinado número de agregación $N=M$, y las micelas más pequeñas que el tamaño óptimo tendrán un área por grupo de cabeza demasiado grande, por tanto habrá un coste energético asociado al contacto del agua con las cadenas hidrocarbonadas. Por otro lado si las micelas son más grandes que el tamaño óptimo sus grupos de cabeza estarán demasiado juntos, entonces la interacción entre estos grupos y la dificultad de empaquetamiento de las cadenas forzará que algunas moléculas de tensioactivo pasen al interior hidrofóbico de la micela. Un mínimo de \mathcal{E}_N puede ser expresado a través de una variación parabólica alrededor del mínimo con amplitud, Λ

$$\mathcal{E}_N = \mathcal{E}_M + \Lambda(N - M)^2 \quad (1.7)$$

Y utilizando la ecuación 1.2 obtenemos una expresión que relaciona X_N y X_M

$$X_N = N \left[\frac{X_M}{M} \exp \left(\frac{M(\mathcal{E}_M - \mathcal{E}_N)}{k_B T} \right) \right]^{N/M} \quad (1.8)$$

Sustituyendo la aproximación parabólica para \mathcal{E}_N , la ecuación 1.8 se expresa

$$X_N = N \left[\frac{X_M}{M} \exp \left(\frac{-\Lambda(M - N)^2}{k_B T} \right) \right]^{N/M} \quad (1.9)$$

Esta ecuación para M suficientemente grande conduce a una distribución prácticamente Gaussiana con varianza,

$$\langle |N - M|^2 \rangle = \frac{k_B T}{2M\Lambda} \quad (1.10)$$

Si el mínimo de la parábola es suficientemente profundo comparado con $k_B T$ la distribución será muy estrecha y en el límite tendremos únicamente monómeros y micelas con número de agregación M es decir

$$X_M = M \left[X_1 \exp \left(\frac{\Delta \mathcal{E}}{k_B T} \right) \right]^M \quad (1.11)$$

donde $\Delta\varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_M$ y la fracción en volumen total de tensioactivo es $\phi = X_1 + X_M$. De esta ecuación se deduce que la CMC será $\phi_c = \exp(-\Delta\varepsilon / k_B T)$.

Para parámetros de empaquetamiento $1/3 < v/l_c a_0 \leq 1/2$, la geometría más probable es la de una micela cilíndrica. Un sistema típico que forma este tipo de micelas son los tensioactivos iónicos convencionales con contraiones hidrofóbicos y/o a altas concentraciones salinas, condiciones en las que a_0 disminuye. Para este tipo de agregados, en principio, ε_N no presenta un mínimo con N , puesto que la energía de las moléculas de tensioactivo, que están en la parte central del cilindro, es independiente de la longitud de este y por tanto de N . La única dependencia con N procede de las terminaciones semiesféricas del cilindro, en estas las moléculas deben empaquetarse en semiesferas para proteger las cadenas hidrocarbonadas del contacto con el agua, lo que produce una contribución positiva a la energía ΔE_{SE} . Así podemos escribir ε_N como la suma de un término constante ε_∞ , procedente de las moléculas en la parte central del cilindro, y la contribución por molécula colocada en alguna de las dos semiesferas, $2\Delta E_{SE} / N = \alpha k_B T / N$

$$\varepsilon_N = \varepsilon_\infty + \frac{\alpha k_B T}{N} \quad (1.12)$$

Y substituyendo de nuevo en la ecuación 1.3 obtenemos

$$X_N = N [X_1 \exp \alpha]^N \exp(-\alpha) \quad (1.13)$$

De donde podemos obtener la fracción en volumen total, ϕ , sumando sobre todas las fracciones

$$\begin{aligned} \phi &= \sum_N X_N = \sum_N N [X_1 \exp(\alpha)]^N \exp(-\alpha) \\ &= \frac{X_1}{[1 - X_1 \exp(\alpha)]^2} \end{aligned} \quad (1.14)$$

A partir de este resultado se puede encontrar un resultado para X_1 en función de la fracción total, ϕ , para valores de esta suficientemente grandes respecto a la CMC [$\text{CMC} \sim \exp(-\alpha)$], es decir [$\phi \exp(\alpha) \gg 1$]

$$X_1 \approx \left(1 - \frac{1}{\sqrt{\phi \exp(\alpha)}}\right) \exp(-\alpha) \quad (1.15)$$

y por tanto X_N vendrá dado por

$$X_N = N \left(1 - \frac{1}{\sqrt{\phi \exp(\alpha)}}\right)^N \exp(-\alpha) \quad (1.16)$$

Al contrario que con micelas esféricas esta distribución es bastante más ancha y asimétrica hacia la zona de números de agregación altos. Siendo el valor más probable de N , $N_{mp} = \sqrt{\phi \exp(\alpha)}$.

Bicapas y vesículas

Para valores del parámetro de empaquetamiento $1/2 < v/l_c a_0 \leq 1$, la geometría preferente es el de una bicapa curvada, formando vesículas o liposomas, o una bicapa o membrana plana ($v/l_c a_0 \approx 1$), las moléculas “anfifílicas” que cumplen estos requisitos geométricos son los tensioactivos bicatenarios, como los lípidos que tiene valores altos de v para un mismo l_c respecto a un tensioactivo monocatenario de la misma longitud de cadena y grupo polar. No es de extrañar, por tanto, que estos lípidos sean los componentes fundamentales de las membranas celulares. En la Figura 1.6 c) se muestra una micela formada por una monocapa de lípidos mientras que en la Figura 1.6 b) se observa una vesícula formada por una bicapa de lípidos, quedando agua atrapada en el interior. En ambos casos, las cabezas de los lípidos están en contacto con el medio acuoso, y dependiendo de las condiciones descritas, se favorecerá la formación de la bicapa o de la micela^[79, 80].

Utilizando argumentos similares a los usados al describir las micelas cilíndricas, podemos estimar la distribución de fragmentos de bicapas presentes por encima de la CMC y por tanto expresar el cambio de energía puesto en juego al colocar una molécula de lípido en una bicapa de número de agregación N como

$$\varepsilon_N = \varepsilon_\infty + \frac{\alpha k_B T}{\sqrt{N}} \quad (1.17)$$

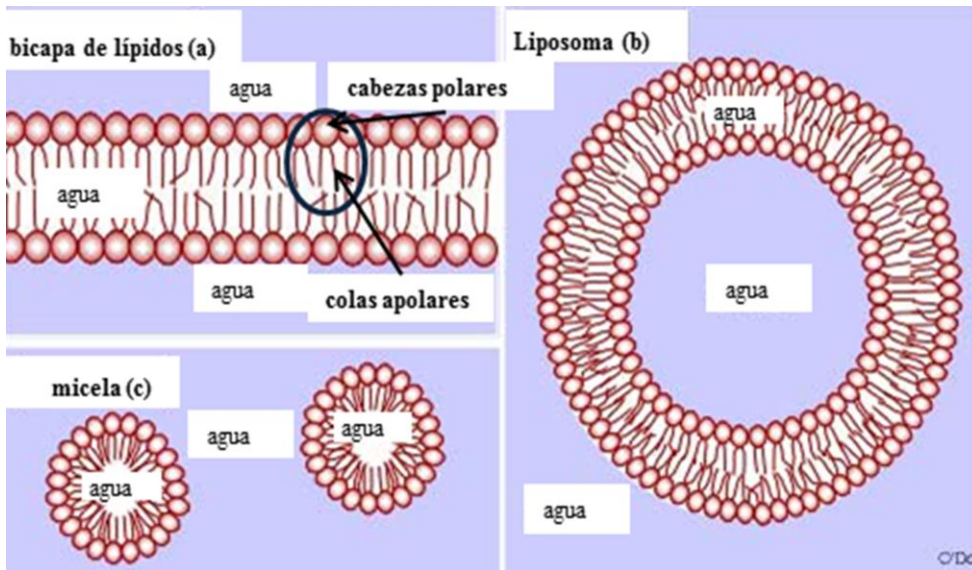


Figura 1.6 a) Representación esquemática de una bicapa de lípidos. b) Representación de una vesícula unilamellar^[9] formada por una bicapa de lípidos. c) Representación de una micela formada por una monocapa de fosfolípidos.

donde el primer sumando corresponde con la energía de una molécula alejada de los bordes de la bicapa y el segundo con la energía de una molécula situada en los bordes. La diferencia entre las ecuaciones 1.12 y 1.17 es puramente geométrica en un agregado en forma de membrana o disco, el número de moléculas en el interior, N , es proporcional al área (es decir, $\sim r^2$) mientras que el número de moléculas en el borde es proporcional al perímetro ($\sim r$) y por tanto $N^{1/2}$. De forma análoga a las micelas cilíndricas, substituyendo en la ecuación 1.3 obtenemos

$$X_N = N[X_1 \exp \alpha]^N \exp(-\alpha\sqrt{N}) \quad (1.18)$$

Es instructivo comparar este resultado con el obtenido para agregados cilíndricos, se encuentra que en lugar del factor $\exp(-\alpha)$, aparece $\exp(-\alpha \cdot N^{1/2})$, y esta dependencia exponencial con $\alpha \cdot N^{1/2}$ implica que no existe una verdadera distribución de tamaños de membranas o discos, por encima de la CMC (que será extremadamente pequeña) las moléculas de lípido que se añadan formarán agregados infinitos, en la práctica un sistema muy

polidisperso dominado por agregados lamelares gigantes. Existe, por supuesto, la posibilidad de que la membrana se cierre sobre sí misma dando lugar a las denominadas vesículas o liposomas, eliminando por tanto los efectos de borde y el factor $N^{1/2}$, sin embargo existe un coste energético en la formación de la vesícula, asociado a la curvatura que se debe impartir a la membrana para formar esta estructura, efecto que se discutirá más adelante.

Para sistemas de un solo tensioactivo en agua, las vesículas son únicamente estables a muy bajas concentraciones (\sim nM), aunque en la práctica pueden formarse en concentraciones razonables utilizando diversas técnicas para aportar energía. No obstante, estos sistemas son metaestables, aunque con una vida suficientemente larga para los tiempos típicos de la mayor parte de los experimentos.

Como se comenta anteriormente, las moléculas *anfifílicas* capaces de formar bicapas son aquellas con valor de v suficientemente altos para llevar el parámetro de empaquetamiento a valores de $\frac{1}{2}$ y 1. Esta condición, que cumplen los tensioactivos bicatenarios como son los lípidos, tiene otras implicaciones que conviene discutir. En primer lugar el aumento de hidrofobicidad entraña una notable disminución en la CMC (\sim nM) y una muy baja solubilidad en agua del lípido respecto al tensioactivo monocatenario convencional. En segundo lugar, la dinámica de entrada y salida del tensioactivo en los agregados se ralentiza considerablemente.

Es conocido, desde el trabajo de Anianson y col^[81] que la formación de micelas (agregados) y por tanto la dinámica con la que estos sistemas llegan a las estructuras de equilibrio, viene determinada por dos procesos de relajación con distintos tiempos característicos. El primer proceso de relajación es rápido y corresponde a la entrada-salida de monómeros individuales del agregado, el tiempo de relajación característico de este proceso es entre 10^{-7} - 10^{-9} s y puede variar en función del tamaño del tensioactivo y la naturaleza del agregado. El segundo proceso es, en general, más lento (10^{-3} s⁻¹) y corresponde a un proceso en el que se equilibra la concentración de tensioactivo libre y la concentración total de micelas, este proceso a veces se denomina como formación-disolución. En tensioactivos con cadenas largas ($-C_nH_{2n+1}$, con $n > 10$) o en bicatenarios es el primer proceso el que controla el estado de equilibrio. El tiempo de residencia del tensioactivo en el agregado, proporcional al tiempo de relajación, es inversamente proporcional a la concentración libre de tensioactivo (i.e. CMC). Es aquí donde aparece una profunda diferencia entre agregados

micelares (tensioactivos monocatenarios, con $\text{CMC} \sim 10^{-3}$ - 10^{-4} M) y bicapas y vesículas (tensioactivos bicatenarios, con $\text{CMC} \sim 10^{-9}$ - 10^{-10} M), en el primer caso los tiempos de residencia son del orden de milisegundos mientras que en el segundo de horas o días.

Hay otros procesos dinámicos, como son la propia difusión superficial de la moléculas de tensioactivo en la superficie del agregado y en una membrana aparece, además, una dinámica denominada “flip-flop”, asociada al intercambio de lípido entre las capas exterior e interior de la membrana. Estos procesos son especialmente importantes en sistemas agregados mixtos, formados por dos o más tensioactivos o lípidos.

Curvaturas y fluctuaciones en una membrana

Anteriormente se comentó que la transformación de una membrana en una vesícula requiere un coste energético asociado a la curvatura que debe adoptar la membrana al cerrarse sobre si misma. Discutiremos brevemente la energía asociada a este proceso y las fluctuaciones de forma de origen térmico inherentes a cualquier membrana. La curvatura de cualquier superficie en un punto puede ser descrita a partir de dos “radios principales de curvatura”, r_1 y r_2 ^[82, 83], a partir de estos radios se puede escribir el cambio de energía asociado al proceso de doblar una membrana, dE_{el} , como la energía elástica necesaria para modificar la forma de un área, dA , adoptando curvaturas c_1 y c_2 .

$$dE_{el} = \left[\frac{k}{2} (c_1 + c_2 - c_0)^2 + k_s c_1 c_2 \right] dA \quad (1.19)$$

donde c_0 , es la curvatura espontánea de la membrana y tiene en cuenta la tendencia de la membrana a doblarse en una u otra dirección dependiendo de las restricciones moleculares de empaquetamiento. Para una monocapa de tensioactivo el radio de curvatura espontánea viene controlado por los factores de empaquetamiento discutidos anteriormente en relación con el parámetro de empaquetamiento. Para una bicapa formada por un solo componente la curvatura espontánea es cero, y cualquier tendencia de una de las capas a curvarse queda compensada por la curvatura contraria (desfavorable) de la otra capa.

Las dos constantes elásticas que aparecen en la ecuación (1.19), k y k_s , se conocen como módulo de doblamiento (“bending”) y módulo de silla

(“saddle-splay”). Para una bicapa estable $k > 0$, lo que quiere decir es que el estado de equilibrio corresponde a curvatura media nula, i.e. $(c_1 + c_2)/2 = 0$. Sin embargo el modulo de silla puede ser positivo o negativo de manera que el sistema puede adoptar una curvatura Gaussiana positiva ($c_1 c_2 > 0$) o en forma de silla, es decir curvatura Gaussiana negativa ($c_1 c_2 < 0$), dependiendo de la interacción molecular específica entre las moléculas de lípido.

Para una determinada forma de la superficie (membrana plana, vesícula,...) solo es necesario considerar el término de energía de doblamiento (“bending”) en la ecuación (1.19), si no se produce ningún cambio topológico en la superficie. Esto permite abordar de forma sencilla el efecto de las fluctuaciones térmicas en una membrana (con curvatura espontánea nula^[84], $c_0 = 0$, considerándola como una película semi-infinita donde se producen distorsiones en la forma, sin cambio en la topología). La energía elástica de deformación será en este caso

$$E_{el} = \int \left[\frac{k}{2} (c_1 + c_2)^2 \right] dA \quad (1.20)$$

Si se considera el movimiento Browniano en la membrana como una serie de distorsiones de la película, pueden ser descritas como ondas estacionarias de vector de onda q y amplitud $a(q)$. La ecuación 1.20 permite calcular la energía de deformación asociada a una de estas ondas estacionarias como $ka^2(q)q^4/2$ por unidad de área. En equilibrio el principio de equipartición permite expresar la energía de cada onda como $k_B T / 2$, encontrándose para la amplitud cuadrática de la onda estacionaria, de longitud de onda $2\pi/q$

$$\langle |a(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Akq^4} \quad (1.21)$$

donde A es el área de la membrana. La distorsión térmica (Browniana) de la membrana en equilibrio corresponderá con la superposición de modos estacionarios sinusoidales de todas las longitudes de onda, con fases aleatorias y amplitudes cuadráticas dadas por la ecuación (1.21). La rugosidad efectiva de la membrana, Δz , se encuentra sumando sobre todas las longitudes de onda:

$$\langle \Delta z^2 \rangle = \int \frac{Aq dq}{2\pi} \frac{k_B T}{Akq^4} = \frac{k_B T}{2\pi k} \int \frac{dq}{q^3} \quad (1.22)$$

La integral en esta ecuación diverge, y el significado físico es que las ondas con longitud de onda grande (del orden del tamaño de la membrana) tendrán amplitudes progresivamente mayores y por tanto debemos visualizar la membrana como altamente rugosa en longitudes de escala grandes, de manera que únicamente podremos considerarla plana a nivel local, por debajo de una longitud de persistencia que depende exponencialmente con k .

Como ya se ha comentado, la doble capa lipídica que forman los liposomas es en general asimétrica, es decir, la distribución de los diversos tipos de fosfolípidos en la capa externa y la capa interna del liposoma es diferente. Esta característica es una constante en la composición de las membranas celulares. La distribución asimétrica de lípidos en la bicapa se deriva de la configuración que deben adoptar en los monómeros como consecuencia de la distinta curvatura en la capa interna y externa. La situación termodinámicamente más favorable será aquella que minimice las interacciones electrostáticas de las cabezas iónicas, con lo que, se tiende a una discriminación de monómeros en razón de su diferente estructura iónica y de su volumen^[84].

1.3.2 Estabilidad coloidal según la teoría DLVO

La teoría DLVO fue la primera teoría que se desarrolló para describir cuantitativamente la estabilidad de las suspensiones coloidales. Debe su nombre a Derjaguin y Landau^[85], Verwey y Overbeek^[86] y establece que la interacción entre dos partículas coloidales se explica mediante un balance de las fuerzas de dispersión atractivas, fuerzas de London-Van der Waals y las de repulsión electrostáticas, debidas al solapamiento de sus dobles capas eléctricas. Estas dos fuerzas se pueden evaluar por separado, gracias a que su origen es independiente. Dependiendo de la magnitud relativa de estas dos interacciones, el valor neto de la interacción puede ser atractivo o repulsivo (Ver Figura 1.7).

En esta teoría se supone que las partículas que interaccionan son tan grandes, comparadas con los iones del polielectrolito de su alrededor que permanecen inmóviles en la disolución, lo que permite expresar la interacción entre las partículas en función de la distancia.

La teoría DLVO también supone que la partícula tiene una distribución de carga superficial uniforme, por lo que no se puede explicar en aquellos casos en los que la distribución de carga sea irregular.

De forma general, la adición de polielectrolitos cargados sobre una disolución de partículas cargadas provoca dos fenómenos: inversión de carga^[87-90] de la partícula y condensación del polielectrolito (*re-entrant condensation*)^[87, 88, 91]. El primero ocurre cuando poliones de carga contraria se depositan sobre la superficie de la partícula y la carga efectiva que caracterizaba a la partícula invierte su signo. El segundo efecto, coincidente con la inversión de carga, consiste en la formación de agregados sobre la partícula y en la disolución. El tamaño de los agregados aumenta con la concentración del polión hasta alcanzar un valor máximo (que es el punto de inversión de carga) a partir del cual decrece hasta volver a su valor inicial o un poco mayor debido al espesor del polielectrolito depositado sobre la partícula.

La formación de estos agregados es independiente del sistema polímero-partícula elegido, ya que ha sido observado en liposomas catiónicos interaccionando con polielectrolitos aniónicos^[87], liposomas híbridos^[92] interaccionando con polielectrolitos catiónicos y en partículas de poliestireno cargadas interaccionando con polielectrolitos naturales^[93, 94] de carga opuesta. Por esta razón, y encontrada la limitación de no poder explicar la heterogeneidad de la carga por la teoría DLVO, se han buscado nuevas herramientas.

Velegol y Twar^[95] modificaron la teoría clásica DLVO teniendo en cuenta la distribución de carga no uniforme sobre la superficie de las partículas. Demostraron que la distribución de carga no uniforme y la superficie de las partículas coloidales dan lugar a un potencial inter-partícula que, incluso en partículas con la misma carga, tiene un componente atractivo.

El modelo se basa en la aproximación de Derjaguin y en una extensión del modelo de Hogg-Healy-Fuerstenau (HHF)^[96]. El potencial resultante depende del promedio del potencial electrostático superficial y de su desviación estándar. Velegol y Twar supusieron que la superficie de la partícula, S , tipo α está formada por N_α regiones (si se nombran como i , va del $i=1, \dots, N_\alpha$) y cada una de ellas tiene un potencial de superficie, ζ_α^i . Estas regiones deben ser de un tamaño suficiente tal que $L \sim \sqrt{S}$, donde L es la longitud de la cadena, así las interacciones laterales se pueden despreciar

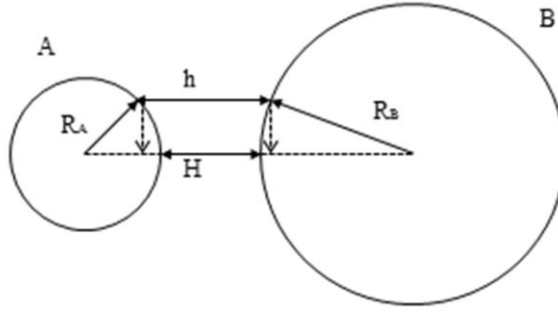


Figura 1.7 Variables que interviene en la aproximación de Derjaguin para dos partículas próximas de radio R_A y R_B , respectivamente.

(prácticamente significa que $L \gg \kappa^{-1}$ y $L \ll H$ donde κ^{-1} es la longitud de Debye). Los potenciales de superficie, ζ_A y ζ_B , de dos partículas que se aproximan en la teoría HHF es por lo tanto remplazado con un valor del potencial individual que depende de la región en la que se esté de la superficie, ζ_A^i y ζ_B^j donde i y j son los dominios (de las partículas de carga opuesta) que en ese momento se encuentran cercanos. Definiendo ζ_α como el potencial medio, se puede escribir: $\psi_\alpha^i = \zeta_\alpha + \delta_\alpha^i$, donde δ_α^i es una contribución que varía en función de la región en la que nos sitúe. Este valor está distribuido de forma independiente y no está correlacionado, es decir:

$$\langle \psi_A^i \psi_B^j \rangle = \begin{cases} \zeta_A^2 + \sigma_A^2 \delta^{ij}, & \text{si } \alpha = \beta = A \\ \zeta_A \zeta_B & \text{si } A \neq B \\ \zeta_B^2 + \sigma_B^2 \delta^{ij}, & \text{si } \alpha = \beta = B \end{cases} \quad (1.23)$$

donde δ^{ij} es la función delta Kröenecker y σ_α es la desviación estándar del potencial de superficie de las esferas tipo α . Así, la expresión resultante para la fuerza media del potencial resultante proporcionado por Velegol y Twar será:

$$\phi_{AB} = \frac{\epsilon \kappa}{2} \sum_{i=1}^M \left\{ \frac{\left(\zeta_A^2 + \zeta_B^2 + 2\zeta_A \delta_i^A + 2\zeta_B \delta_i^B + \delta_A^2 + \delta_B^2 \right) (1 - \coth \kappa h_i) + 2(\zeta_A + \delta_i^A)(\zeta_B + \delta_i^B)}{\cosh \kappa k_i} \right\} S \quad (1.24)$$

donde M es la suma de todas las regiones implicadas de las partículas y h_i es la distancia entre las i regiones. La media viene dada por:

$$\langle \phi_{AB} \rangle = \frac{\varepsilon K}{2} \sum_{i=1}^M \left\{ \frac{(\zeta_A^2 + \zeta_B^2 + \delta_A^2 + \delta_B^2)(1 - \coth \kappa h_i) + 2\zeta_A \zeta_B}{\cosh \kappa k_i} \right\} S \quad (1.25)$$

Si se aplica la aproximación de Derjaguin, la suma anterior puede escribirse como

$$h \approx H + \frac{R_A + R_B}{2R_A R_B} r^2 \quad (1.26)$$

y para cualquier función genérica entre las superficies de dos esferas, $F(h)$, se emplea la siguiente función:

$$\sum_{i=1}^M F(h_i) A_i \approx 2\pi \frac{R_A R_B}{R_A + R_B} \int_0^{+\infty} F(h) dh \quad (1.27)$$

donde r es el radio del anillo, de manera que el par de fuerzas del potencial de interacción medio queda

$$\langle \phi_{AB} \rangle = \frac{\varepsilon \pi R_A R_B}{R_A + R_B} \left[\frac{(\zeta_A^2 + \zeta_B^2 + \sigma_A^2 + \sigma_B^2) \ln(1 - e^{-2\kappa H}) + 2\zeta_A \zeta_B \ln\left(\coth \frac{\kappa H}{2}\right)}{2} \right] \quad (1.28)$$

donde ε es la permitividad dieléctrica del medio de dispersión, κ^{-1} es la longitud de Debye y H es la distancia entre las superficies de las partículas.

Como podemos observar, el potencial combina un término de carga neta de repulsión ($\zeta_\alpha \neq 0$) y otro de atracción ($\sigma_\alpha \neq 0$) debido a la heterogeneidad de la carga y conduce a la presencia de una barrera de energía. El valor máximo de este potencial representa la barrera de energía que la partícula debe sobrepasar para producirse la adsorción del polielectrolito sobre la misma.

Cuando se cumplen las siguientes condiciones: $\kappa R_\alpha \gg 1$ y $H R_\alpha \ll 1$ siendo $\alpha=A,B$; si ζ_A y ζ_B son relativamente pequeños (menos de 25mV a

temperatura ambiente) y las partículas son de la misma naturaleza química y con cargas similares, se recupera la aproximación de Derjaguin.

Si las dos partículas están uniformemente cargadas, $\sigma_\alpha = 0$, la expresión se convierte en la expresión de HHF para dos esferas idénticas:

$$\langle \phi_{AB} \rangle_{\max} = \varepsilon \pi R \left[\begin{aligned} & (\zeta^2 + \sigma^2) \ln \left(1 - \left(\frac{\zeta^2}{\zeta^2 + \sigma^2} \right)^2 \right) + \\ & \zeta^2 \ln \left(\frac{2\zeta^2 + \sigma^2}{\sigma^2} \right) \end{aligned} \right] \quad (1.29)$$

y, por tanto, la distancia máxima a la que se encuentran dos partículas queda

$$H_{\max} = \frac{1}{\kappa} \ln \left(\frac{\zeta^2 + \sigma^2}{\sigma^2} \right) \quad (1.30)$$

El valor de $\langle \phi \rangle_{\max}$ de esta barrera aumenta linealmente con el radio de la curvatura, R , de las superficies de las partículas que se aproximan, y para partículas deformables (como es el caso de polielectrolitos que recubre los liposomas), el tamaño del agregado depende del potencial superficial ζ . A baja fuerza iónica hay una contribución de fuerzas de atracción de Van der Waals que opera a distancias muy cortas pero que apenas modifica la situación. Al realizar una simulación utilizando el potencial de Velegol-Twar, y modelizando la coagulación como un proceso de agregación debido a la compactación producida sobre los liposomas, se concluye que cuando se alcanza la barrera típica de energía $10k_bT$, el grupo de liposomas queda cinéticamente estabilizado. Como consecuencia, se puede escribir una expresión para el radio cinético de equilibrio:

$$R_{eq} \approx \frac{10K_bT}{\pi\varepsilon} \left\{ (\zeta^2 + \sigma^2) \ln \left[1 - \left(\frac{\zeta^2}{\zeta^2 + \sigma^2} \right) \right] + \zeta^2 \ln \left[\frac{2\zeta^2 + \sigma^2}{\sigma^2} \right] \right\}^{-1} \quad (1.31)$$

Resumiendo, el modelo de Velegol y Twar considera que:

- La anchura de la barrera de potencial no depende de la longitud de Debye k^{-1} . Como consecuencia, si se varía la fuerza iónica no cambia la fuerza de interacción, tan solo modifica la distancia a la que ocurre la interacción máxima.

- Usando la aproximación de Derjaguin, se da una dependencia lineal entre la anchura de la barrera con el radio de las partículas, de forma que partículas más grandes interaccionan más que las pequeñas y por tanto la agregación en las grandes queda inhibida.
- $\langle \phi \rangle_{max}$ es cero cuando $\zeta = 0$ y el $\lim_{\sigma \rightarrow 0^+} H_{max} = 0$. Esto es consistente con la no existencia de componente atractiva para partículas uniformemente cargadas y un valor bajo de σ determina la interacción de corto alcance.
- Partículas coloidales con pequeño radio de curvatura o alta anisotropía respecto a la distribución de carga, serán caracterizadas por una agregación más rápida.

En los cálculos generales, la contribución de atracción asociada a la interacción de Van der Waals entre dos partículas es despreciable. Para el caso de liposomas formados por una bicapa cuyo interior es el disolvente, se caracteriza por dos radios, interno y externo correspondiente a la bicapa. La interacción de Van der Waals puede describirse como:

$$V_{rdW} = -\frac{AR_1R_2}{6(R_1 + R_2)} \left[\frac{1}{H + 2d} - \frac{2}{H + d} + \frac{1}{H} \right] - \frac{A}{6} \ln \left[\frac{H(H + 2d)}{2(H + d)} \right] \quad (1.32)$$

donde A es la *constante de Hamaker*. Los resultados típicos procedentes de la resolución de esta ecuación para liposomas son para una atracción entre partículas a una distancia de 1-2 nm. Como la distancia es siempre más pequeña que H_{max} , la fuerza de van der Waals se desprecia en el proceso de agregación irreversible.

1.3.3 Clasificación de liposomas

Para que los liposomas se formen es necesario que se alcance una concentración mínima, conocida como *concentración vesicular crítica*, $cvc^{[84]}$. Además de este parámetro, las disoluciones vesiculares se caracterizan por la lamelaridad vesicular, la polidispersidad de tamaños y la micropolaridad de los diferentes microentornos vesiculares. La clasificación de los liposomas se puede realizar en base a tres criterios: atendiendo a sus características fisicoquímicas, al proceso por el que han sido elaborados y a las aplicaciones de los liposomas.

Para la clasificación de los liposomas en función de sus características fisicoquímicas, se tiene en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared del liposoma^[97].

En el caso de ser una sola bicapa la que separa el interior del disolvente externo, según se observa en la Figura 1.8, las estructuras se clasifican en función de su tamaño como vesículas unilamelares pequeñas^[98, 99] (SUV) cuyo tamaño puede ser desde 40 hasta 100 nm, grandes (LUV) cuyo tamaño puede ser hasta de 500 nm o gigantes^[100, 101] (GUV) con un tamaño mayor a 1 μm . También se ha encontrado que varias vesículas unilamelares están formando parte de una vesícula mayor, a este tipo se denomina vesícula multivesicular (MVV) con tamaño mayor a 1 μm ^[102].

En la Figura 1.8 las vesículas con varias bicapas que atrapan en su interior parte del disolvente se les llama multilamelares (MLV) y su tamaño será mayor a 500 nm. Las vesículas multilamelares cuyo tamaño está en el rango de 100 nm hasta 1 μm se denominan oligomelares (OLV)^[9].

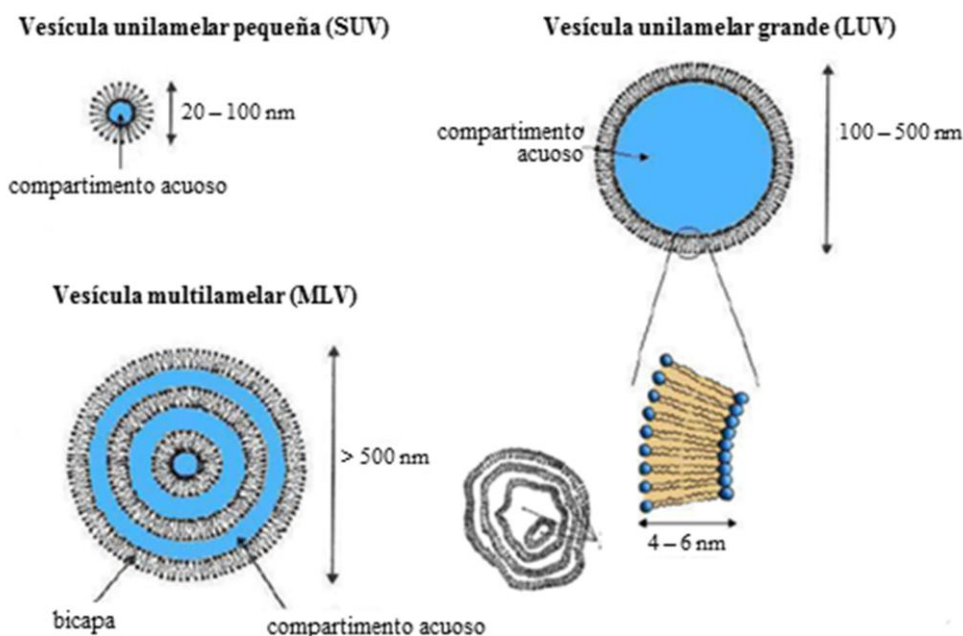


Figura 1.8 Diferentes tipos de vesículas: SUV o vesículas unilamelares pequeñas, LUV o vesículas unilamelares grandes y MLV^[27, 28] o vesículas multilamelares.

1.3.4 Técnicas de obtención de liposomas

Obtención de Liposomas tipo SUV. Se utiliza el denominado método de dispersión simple^[9], que es el más conocido y sencillo, y se realiza en varias etapas^[54, 97, 103]:

- *Liofilización o evaporación* para la obtención de la bicapa lipídica a partir de disoluciones de lípido en medios no polares. Se parte de lípidos disueltos en disolventes orgánicos como son el cloroformo o el ciclohexano. Las disoluciones de los distintos lípidos que pretenden utilizarse se mezclan en proporción adecuada, dependiendo el tipo de liposoma con el que se quiere trabajar, y en el caso de la mezcla, ésta queda optimizada. El disolvente se evapora mediante una bomba de vacío o con ayuda de una corriente de N₂ o Ar obteniéndose una fina película formada por la bicapa lipídica sobre las paredes del vial con el que se trabaja^[104].
- *Hidratación* de la bicapa lipídica y dispersión en medios polares tales como agua, o disolución tampón, generalmente se regula la fuerza iónica para que la disolución adquiera la conductividad eléctrica adecuada. La hidratación debe hacerse por encima de la temperatura de transición del lípido durante 30 minutos y con ayuda de un agitador mecánico. De esta forma parte del agua queda atrapada en la bicapa lipídica y el resto queda inmerso en el interior del liposoma, el cual se forma espontáneamente en contacto con la disolución acuosa. Los liposomas obtenidos de esta forma son fundamentalmente SUV pero, como al formarse espontáneamente, no existe un control directo del tamaño obtenido, por ello hay que utilizar posteriormente la técnica de la extrusión para que el tamaño de los liposomas sea más homogéneo^[105].
- En la *extrusión* de fosfolípidos, las vesículas unilamelares y multilamelares se hacen pasar por un filtro de policarbonato de un tamaño de poro definido (en este trabajo se han utilizado de 50, 100, 200 y 1000 nm de diámetro), en el que al final quedarán retenidas únicamente las bicapas que no han formado vesículas; la mayoría de los liposomas de la disolución así obtenidos serán unilamelares^[98, 106, 107].

Además del método de dispersión simple existen otros métodos para obtener este tipo de liposomas:

- Inyección de etanol o éter: Los lípidos de partida se disuelven en etanol o éter, y la disolución se inyecta rápidamente en una disolución tampón con la que se quiere trabajar, dando lugar a la formación espontánea de vesículas, principalmente SUV, aunque también se forman algunas MLV. Posteriormente se lleva a cabo una ultrafiltración para eliminar los posibles restos de etanol o éter según sea el caso^[108].
- Diálisis del detergente: Este es el caso cuando las vesículas se preparan mezclando detergente y fosfolípidos, lo que inicialmente da lugar a la formación de micelas mixtas, de forma que una vez que se dializa el detergente se obtienen liposomas unilamelares^[109].

Existen otros métodos para obtener diferentes tamaños de liposomas, que no van a utilizarse en esta tesis pero que es importante conocer.

Obtención de Liposomas tipo LUV. El método utilizado se denomina evaporación en fase reversa^[110], y utiliza un volumen muy pequeño de fase acuosa en la solución orgánica en la que están inmersos los fosfolípidos (relación molar 1:3). Tras la adición de la fase acuosa por encima de la temperatura de transición del lípido, la mezcla se sonica dando lugar a una emulsión. La fase orgánica se elimina a presión reducida dando lugar a liposomas en una fase de gel intermedio. Finalmente tras una fuerte agitación se obtiene una disolución concentrada de vesículas muy polidispersa desde pocos nanómetros hasta 10 μm según la composición y concentración de los lípidos, la temperatura, fuerza de sonicación y tiempo. Con este método se obtienen liposomas, que durante el tiempo de almacenamiento a una temperatura generalmente por debajo de la temperatura de transición, no son estables por su elevada curvatura por lo que tienden a fusionarse. Un problema asociado a este método es que las

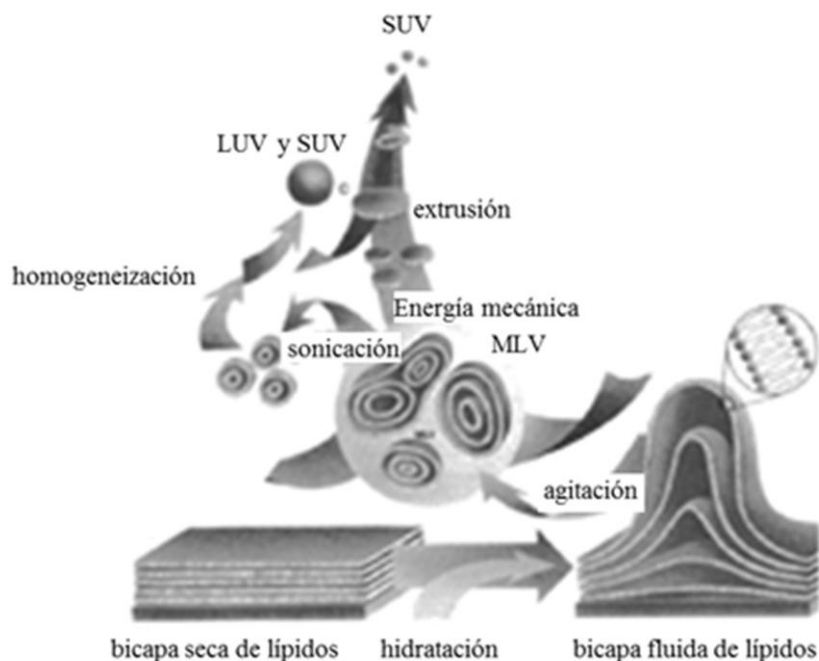


Figura 1.9 Procedimientos para la obtención de liposomas. El método de dispersión simple para obtener MLV. A partir de ellos, el método de extrusión para obtener SUV o el método de sonicación-homogeneización para obtener LUV^[14].

condiciones de trabajo son difícilmente reproducibles.

Obtención de Liposomas tipo MLV. Se trata de un protocolo que incluye varios ciclos de evaporación del disolvente y sonicación^[111]. Se inicia con el proceso de evaporación del cloroformo en el que se encuentran los lípidos y una vez se tiene la bicapa de lípidos, se añade ciclohexano con un pequeño volumen de etanol (1-2% del volumen total) para aumentar la miscibilidad. Se liofiliza la muestra con ayuda de un sistema de vacío durante al menos 5 horas. Así, la película de lípidos otra vez formada y es el momento de pasar al proceso de hidratación de la bicapa lipídica, por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos, se agita enérgicamente mediante un sonicador. Este proceso permite obtener vesículas multilamelares, pero el tamaño y la lamellaridad es difícil de controlar^[112].

La relación que existe entre los tres tipos de liposomas se observa en la Figura 1.9, según la cual tras la hidratación de la bicapa lipídica se forman de forma espontánea liposomas multilamelares de diferente tamaño. Según se aplique energía mecánica, tipo vórtex o sonicación se obtiene liposomas unilamelares pequeños o grandes. La extrusión es el método que obtiene un tamaño más homogéneo y controlado de los liposomas ya que depende del número de extrusiones que se realizan, mientras que la sonicación depende, entre otros factores, del tiempo de sonicación y generalmente no es reproducible.

En todos los casos, una vez obtenidos los liposomas, se deben almacenar a una temperatura entre 4-8°C a pH 7. En general su estabilidad en disolución es de una semana^[113].

1.3.5 Aplicaciones de los liposomas

En sus comienzos los liposomas fueron utilizados para mimetizar membranas celulares. A medida que los estudios avanzaban se encontraron nuevas aplicaciones, entre las que destaca la vehiculización de principios activos en el sector farmacéutico por su prolongado tiempo de circulación^[114]. Su versatilidad los ha convertido en sistemas de gran interés para biólogos, médicos, farmacéuticos y la industria (farmacéutica, cosmética, alimentaria, etc)^[115].

En el sector farmacéutico los liposomas utilizados están formados principalmente por fosfatidilcolinas. Este lípido es el principal componente de la membrana celular, por lo que los liposomas se difunden en los tejidos con mucha facilidad. Se utilizan como vía de encapsulación de moléculas y principios activos ya sean hidrosolubles o liposolubles y para la diagnosis y tratamiento de infinidad de enfermedades, como el cáncer y ya en los últimos años en la terapia génica^[116, 117].

La liberación de fármacos constituye un campo importante tanto por la relación dosis/actividad, como la aplicación puntual del medicamento sin tener que recurrir a la invasión generalizada del organismo cuando solo sea necesario en un determinado punto del organismo^[118]. En principio, un sistema de liberación de fármacos debe controlar el lugar apropiado para el principio activo y el momento adecuado de dosificación. Los primeros sistemas se centraban en perfiles constantes (cinéticas de orden cero) para evitar problemas asociados a la administración convencional necesaria en el tratamiento de enfermedades crónicas. En la actualidad, los nuevos sistemas de liberación de fármacos incluyen la optimización en la acción hacia los tejidos y de las formas de dosificación para conseguir una respuesta adecuada con mínimo efecto no deseable. Además se intenta que cubran otras necesidades como conseguir una liberación lenta de fármacos hidrosolubles, mejorar la biodisponibilidad de medicamentos poco solubles en disoluciones acuosas, desarrollar unos contenedores biodegradables y controlar la liberación de medicamentos tóxicos^[119].

Para conseguir este tipo de sistemas, las investigaciones actuales siguen tres criterios independientes: el tiempo de dosificación, el punto de aplicación y la sensibilidad al estímulo-respuesta. Además de tener en cuenta cualquiera de los criterios comentados, hay que tener en cuenta varios aspectos referentes a sus componentes y al método de preparación que se pueden resumir en los siguientes:

- Cuanto más elevada es la concentración del lípido, mayor es la proporción de la fase acuosa atrapada y además su vida media aumentará.
- El índice de encapsulación aumenta al realizar la hidratación lentamente.
- La adición de fosfolípidos cargados que hace más grande la distancia entre las membranas lipídicas, aumenta la cantidad de sustancia liposoluble que puede ser encapsulada en entre la bicapa lipídica.

El método de preparación se elegirá en función de la composición, tipo de liposoma y naturaleza del principio activo que se pretende incluir en el sistema^[120].

Desde el punto de vista de aplicaciones de los liposomas como consecuencia de las modificaciones que, con diferentes fines, se hayan podido introducir en su estructura, se distinguen los siguientes tipos de liposomas:

- Liposomas convencionales.
- Liposomas de circulación prolongada o *stealth liposomas*.
- Liposomas catiónicos.
- Inmunoliposomas.

Liposomas convencionales Son los liposomas clásicos de superficie hidrofóbica, constituidos por ejemplo por fosfatidilcolina y colesterol que, tras su introducción en la membrana celular son rápidamente recubiertos por las proteínas plasmáticas y a continuación eliminados de la circulación, tras ser fagocitados por las células^[121].

Liposomas de circulación prolongada (Stealth liposomes), en los que la presencia de PEG en su superficie incrementa su hidrofilia, dando lugar a una reducción en la interacción con proteínas plasmáticas y lipoproteínas^[122, 123]. Esta modificación de los liposomas a la cual, teniendo en cuenta el material utilizado, se ha dado en llamar *pegilación*, sirve para conseguir dos funciones muy importantes: la primera, un incremento en la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados, y la segunda, que el proceso de liberación sea más lento y que se minimice la toxicidad y los efectos secundarios^[124]. Además del PEG, otros polímeros como la poliacrilamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para lograr los mismos objetivos^[125]. Estos liposomas se utilizan preferentemente para la liberación de fármacos en zonas en las que hay un proceso infeccioso o una inflamación^[121].

Inmunoliposomas tienen la capacidad de dirigirse específicamente y reconocer algunas células y órganos del cuerpo. Esto se consigue mediante la presencia de determinados elementos introducidos en el diseño de su estructura, como pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, unidos a la superficie de los liposomas^[126]. La elección del antígeno diana, la función del anticuerpo y el tipo del entrecruzador utilizado para lograr su

unión a la superficie son factores que requieren un análisis exhaustivo en el diseño de este tipo de liposomas^[127].

Liposomas catiónicos, en los que su principal aplicación es la vehiculización de material genético^[116]. Los lípidos catiónicos constitutivos de estos liposomas neutralizan la carga negativa del ADN, formando así una estructura compacta aunque diferente de la estructura vesicular típica de los liposomas. Estos complejos resultantes de la interacción entre el ADN y los lípidos catiónicos proporcionan una protección al material genético^[121].

1.3.6 Liposomas cargados

Esta tesis se centrará en vesículas fosfolipídicas cargadas^[128], por lo que se procederá a una descripción sucinta de las mismas.

La carga superficial de un liposoma crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana^[129]. Esta carga superficial es muy importante en la estabilidad coloidal de los liposomas ya que los procesos de agregación y fusión de estos sistemas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas.

La composición fosfolipídica de la bicapa marca la carga superficial de los liposomas. En la Tabla 1.2 se muestra la carga de las cabezas polares que es lo que proporciona la carga al mismo.

La agregación de liposomas neutros se produce por interacciones de Van

Tabla 1.2 Nombres y estructuras de algunas cabezas polares más utilizadas

Región polar	Nombre	Abreviatura	Carga
-OH	Ácido fosfatídico	PA	Negativa
-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₃	Fosfatidilcolina	PC	Zwiteriónico
-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Fosfatidiletanolamina	PE	Zwiteriónico
-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺ COO ⁻	Fosfatidilserina	PS	Negativa
-CH ₂ CHOH CH ₂ OH	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
-HC ₆ H ₅ (OH) ₅	Fosfatidilinositol	PI	Negativa

der Waals. Es un fenómeno natural e inevitable para este tipo de liposomas pero es posible vencerla si se introduce carga, es decir, se mezclan lípidos^[102]. La teoría en la que se basa la estabilidad coloidal es la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO)^[60, 130] que describe las fuerzas de interacción que se producen. Se supone que el potencial de interacción total entre dos partículas es la suma del potencial repulsivo electrostático y el potencial atractivo de Van der Waals.

Teniendo en cuenta esta teoría, un sistema es estable si la repulsión electrostática entre dos partículas es superior a las fuerzas de Van der Waals existentes entre ellas. Desde el punto de vista termodinámico, los liposomas son sistemas inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse para así disminuir su energía libre y su área. Si permanecen estables es como consecuencia de la existencia de un mecanismo estabilizador (repulsión electrostática, impedimentos estéricos). Por lo tanto, trabajar con liposomas cargados almacenados a baja fuerza iónica es recomendable y ventajoso^[9].

La teoría DLVO ha tenido aportaciones relacionadas con términos energéticos asociados a parámetros que no habían sido tenidos en cuenta, volviéndose más general^[131]. Esto permite el desarrollo de nuevos métodos de estabilización de vesículas cargadas, incluyendo el ensamblaje de polielectrolitos sobre el liposoma mediante reacciones químicas muy simples o combinando la interacción electrostática y la reacción química, de manera que se pueden obtener liposomas mucho más versátiles^[37].

1.4 MICROGELES

Se denomina microgel a una red de polímeros formada por el entrecruzamiento de cadenas que son capaces de absorber y retener polímeros solubles en su interior^[132] y cuyo tamaño oscila de 100 nm a 1 μ m, lo que les diferencia de sus homólogos hidrogeles (Ver Figura 1.10).

Todos los microgeles absorben agua pero no todos dan una respuesta en función del estímulo exterior. Teniendo esto en cuenta, en esta tesis tan solo se va a hablar de los microgeles con un tamaño inferior a 1 μ m que

responden a un estímulo externo (T, pH, etc.) denominados polímeros inteligentes o *smart materials*.

Según las búsquedas realizadas, la primera vez que se acuñó el término “smart material”^[133] fue en un artículo periodístico del año 1988. En este trabajo se describía el uso de fluidos electrorreológicos (ER) para crear materiales inteligentes. Estos fluidos tenían potencial para cambiar su viscosidad casi instantáneamente en respuesta a una corriente eléctrica. El hecho ponía de manifiesto la existencia de un nuevo tipo de material con capacidad para modificar sus propiedades en un momento determinado y ajustarse a cambios en condiciones del entorno^[134].

En ese mismo año, apareció un artículo de revisión sobre los polímeros conductores funcionales, donde se vislumbraba su aplicación potencial como materiales inteligentes. Dos años más tarde, en 1991 se publicó un artículo sobre hidrogeles y polímeros sensibles a estímulos externos y sus aplicaciones como biomateriales inteligentes^[135].

Los polímeros con memoria de forma se distinguen por su baja densidad y presentan la capacidad de recuperarse de grandes tracciones impuestas por cargas mecánicas, sin sufrir ningún tipo de degradación material. Estos materiales fueron patentados por primera vez por una compañía japonesa en 1984^[136] y desde entonces han sido numerosos los tipos de polímeros comercializados.

Los polímeros que responden a estímulos externos, son materiales que responden con cambios grandes y bien definidos a pequeños cambios físicos como pH^[137], temperatura^[138, 139], fuerza iónica, naturaleza y composición del medio^[140]. En la mayoría de estos materiales existe un valor en el que ocurre un cambio estructural, y además esta transición que sufren es completamente reversible. En 1998 Wu, C y Wang, X describieron por primera vez una transición térmica ovillo-glóbulo de una cadena lineal de Poli-(N-isopropilacrilamida), p-(NIPAM) de alto peso molecular^[141].

Estos polímeros disueltos en disolución acuosa, cuando se estimulan^[142] se hinchan aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar un equilibrio químico-físico sin perder su forma. El estado hinchado es el resultado del balance de fuerzas dispersivas y cohesivas intermoleculares que actúan en las cadenas hidratadas. Las fuerzas cohesivas se deben principalmente a los entrecruzamientos covalentes y las fuerzas dispersivas se deben más a las interacciones dipolo-dipolo o fuerzas electrostáticas^[143].

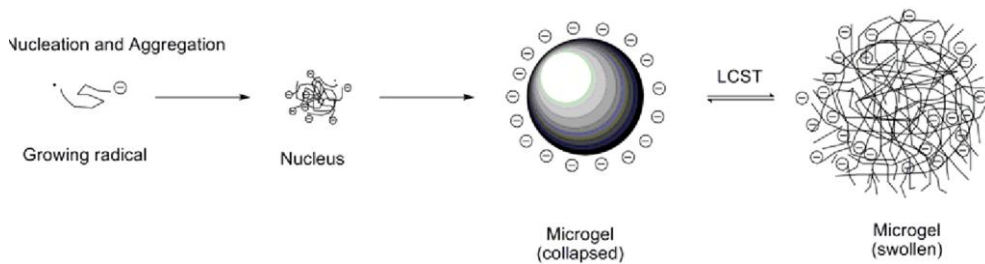


Figura 1.10 Mecanismo de formación de un microgel cuya temperatura consoluta inferior, LCST, indica si ha absorbido agua mostrando una estructura hinchada o no denominándose microgel colapsado^[16].

Los microgeles se clasifican en función del tipo de estímulo al que responden, aunque en esta tesis tan solo se va a hablar de dos tipos, con respuesta a la temperatura y con respuesta al pH. Estos estímulos son claves en los procesos biológicos. Es posible ver los dos efectos en un mismo microgel si se copolimerizan polielectrolitos débilmente ionizados con las redes de microgel termosensible^[144, 145].

Los microgeles termosensibles entrecruzados covalentemente son quizás los más estudiados en el área de polímeros sensibles a estímulos externos, entre los que destacan los derivados de p-(NIPAM), que como son con los que se ha trabajado en esta tesis nos referimos a ellos y a su comportamiento a partir de ahora.

1.4.1 Geles sensibles a la temperatura

Microgeles sensibles a la temperatura son aquellos que en disolución sufren algún tipo de cambio en su conformación al variar la temperatura. Dado que forman enlaces de hidrógeno con el agua, las perturbaciones en los enlaces producidas por la variación de la temperatura causan separaciones de fase o contracciones que desde el punto de vista termodinámico el proceso se describe como

$$\Delta G_{mez} = \Delta H_{mez} - T\Delta S_{mez} < 0 \quad (1.33)$$

siendo la energía libre de mezcla del proceso negativa^[17] para que el microgel no precipite^[146]. Si las moléculas del microgel no estuvieran

entrecruzadas, éste se disolvería en el disolvente para mantener negativo el valor de la energía de mezcla, ΔG_{mez} , apareciendo una componente elástica, ΔG_{elas} que marca el límite de la expansión que sufre el microgel en disolución^[146, 147].

Como una primera aproximación, podemos tomar como situación de referencia aquella en que ΔS y ΔH son positivos y las interacciones polímero-polímero y disolvente-disolvente suelen ser preferidas a las polímero-disolvente (aumento entálpico en la mezcla). Para este caso y desde el punto de vista termodinámico hay una competencia entre el término entrópico (que contribuye positivamente a la mezcla) y el entálpico (que contribuye negativamente). La energía libre de mezcla está dada por la teoría de Flory- Huggings^[148]:

$$\Delta G_{mix} = k_B T \frac{V}{a^3} \left[(1-\phi) \ln(1-\phi) + \chi \phi (1-\phi) \right] \quad (1.34)$$

donde V es el volumen del microgel, a es la longitud del segmento monomérico, ϕ es la fracción molar del polímero y χ es el parámetro de interacción de Flory- Huggings. Si V_0 es el volumen del microgel antes de la expansión, ϕ_0 es la correspondiente fracción del volumen, n_c es el número de las cadenas poliméricas, la energía elástica viene dada por la ecuación (1.35)

$$\Delta G_{elas} = \frac{3}{2} n_c k_B T \left(\frac{\phi_0}{\phi} \right)^{2/3} \quad (1.35)$$

Y la energía libre se convierte en:

$$\Delta G = \Delta G_{mez} + \Delta G_{elast} = k_B T \left(\frac{V_0}{a^3} \right) \left[\left(\frac{\phi_0}{\phi} \right) \{ (1-\phi) \ln(1-\phi) + \chi \phi (1-\phi) \} + \frac{3n_c a^3}{2V_0} \left(\frac{\phi_0}{\phi} \right)^{2/3} \right] \quad (1.36)$$

En el equilibrio el potencial químico del disolvente, μ_s , debe satisfacer la condición de

$$\mu_s(\phi, P + \Pi, T) = \mu_s(0, P, T) \quad (1.37)$$

donde Π es la presión osmótica que corresponde con la presión necesaria para mantener el equilibrio de las moléculas del disolvente^[146, 149]. De esta forma,

$$\Pi = \left(\frac{k_B T}{a^3} \right) \left[-\phi - \ln(1-\phi) - \chi \phi^2 + \left(\frac{\phi_0}{N_{gel}} \right) \left\{ \frac{1}{2} \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right) - \left(\frac{\phi}{\phi_0} \right)^{1/3} \right\} \right] \quad (1.38)$$

donde N_{gel} es el la media del grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas. Una vez que el equilibrio se ha alcanzado, la presión osmótica de las moléculas del disolvente dentro del microgel debe ser cero asumiendo condiciones isobáricas, los cambios de volumen del microgel pueden ser calculados^[146, 150]. En esta situación de equilibrio se obtiene la ecuación desarrollada por Flory-Rehner^[151, 152], quienes lo aplican a redes poliméricas simples en presencia de moléculas pequeñas.

Vemos en la ecuación (1.33) que la temperatura, que está en el componente entrópico puede jugar un papel importante en la solubilización o mezcla. Si se supone que la situación es $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, se parte de condiciones de mezcla ($T\Delta S > \Delta H$) y se disminuye la temperatura se llega a un valor tal que el componente entálpico iguale al entrópico. Por debajo de esta temperatura no habrá mezcla completa o solubilización completa sino que se producirá una separación de fases. Este proceso, por otra parte, es reversible, de forma que si se calienta la solución de nuevo se obtiene una mezcla homogénea. Hay que hacer varios comentarios a la descripción anterior. En primer lugar, la temperatura de separación de fases depende de la concentración de polímero tal y como se muestra en la Figura 1.11 a),

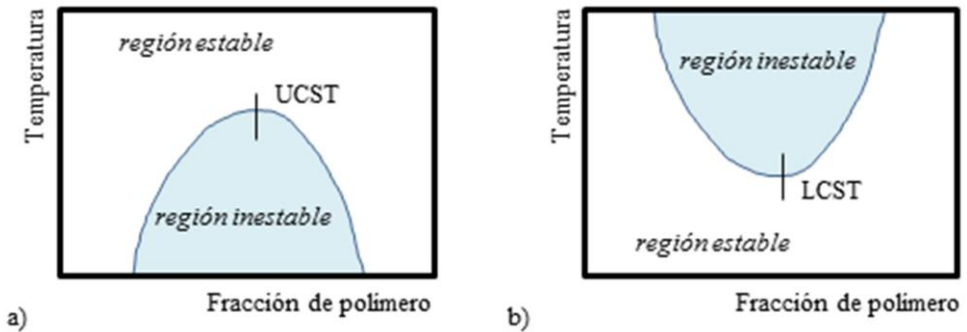


Figura 1.11 Diagrama de fases para el comportamiento de un microgel ideal con: a) temperatura consoluta superior o máxima a la que el microgel se calienta para que se disuelva (UCST) y b) temperatura consoluta inferior o mínima a la que hay que calentar para que el microgel no precipite (LCST)^[12].

donde se ha dibujado un diagrama de fases ideal de un sistema polímero/disolvente de este tipo. Por tanto, la solubilidad de un polímero depende de la temperatura y de la concentración. En segundo lugar, separación de fases no significa formación de fases puras de polímero y disolvente sino de fases ricas en uno y en otro, como también se indica en la Figura 1.11 a). Al máximo de la curva en el diagrama de fases se le denomina punto crítico, y tiene asociado una temperatura crítica y una concentración crítica. A este tipo de comportamiento se le identifica como UCST (*upper critical solution temperature*), es decir, temperatura consoluta superior entre la curva binodal y espinodal.

Sin embargo, no siempre los diagramas de fases son tan simples como el mostrado en la Figura 1.11 a). Muchos de los polímeros solubles en agua (como las poli-alquil-acrilamidas, familia a la que pertenece p-(NIPAM) presentan intervalos de temperatura en los que las variaciones entálpicas y entrópicas son negativas, por diferentes razones: ΔH puede ser negativo debido a la contracción de volumen, y ΔS puede ser negativa debido a cuestiones relacionadas con el empaquetamiento molecular. En este caso, si $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, se está en una situación inversa a la anterior: el componente entálpico contribuye a la mezcla y el entrópico no, por lo que si se parte de una situación de mezcla homogénea, es un aumento de la temperatura el que da lugar a la separación de fases puesto que se llegará a una temperatura en que el término entrópico sea más relevante que el entálpico. En este caso, el diagrama de fases tiene la forma que se muestra en la Figura 1.11 b), y a este comportamiento se le llama LCST^[153] (*lower critical solution temperature*) o temperatura consoluta inferior, ya que en este caso, el punto crítico, definido de nuevo por una temperatura crítica y una concentración crítica, es el mínimo de la curva^[12].

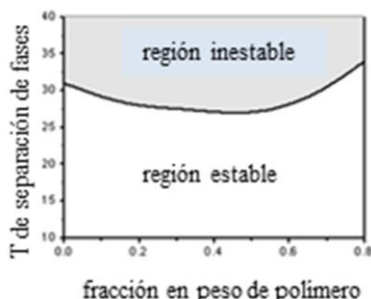


Figura 1.12 Diagrama de fases de p-(NIPAM) formado por dos regiones^[12].

En realidad, la UCST y la LCST suelen coexistir en el diagrama de fases como se observa en la Figura 1.12 ya que hay variaciones de signo de ΔH y ΔS con la temperatura), siendo habitualmente $UCST > LCST$ para los polímeros solubles en agua, por lo que se definiría en principio una región bifásica enmarcada por las dos curvas de separación de fases.

La separación de fases tipo LCST, es decir, temperatura consoluta inferior se considera que está entrópicamente inducido (ya que es el factor entrópico el que contribuye negativamente a la mezcla). Por el contrario, el tipo UCST se dice que está entálpicamente inducido. En el caso del p-(NIPAM), la UCST puede estar por encima del punto de ebullición del agua y no es observable. El comportamiento LCST está íntimamente relacionado con el balance hidrófilo/hidrófobo de la cadena.

Podemos considerar que hay una competencia entre el componente entrópico y el entálpico, estando este último relacionado con el número de moléculas de agua unidas al polímero mediante enlaces de hidrógeno. Por debajo de la LCST el componente entálpico es más importante y predominan las interacciones hidrófilas (enlaces de hidrógeno con el agua) y hay mezcla homogénea, mientras que por encima de la LCST es más importante el componente entrópico y se produce la separación de fases en la que las interacciones hidrófobas polímero/polímero son las preferidas. La capacidad de formación de enlaces de hidrógeno y por tanto la LCST se pueden modular mediante copolimerización con monómeros hidrófilos (aumento de LCST) o monómeros hidrófobos (disminución de LCST).

El comportamiento descrito en la Figura 1.11 es el que corresponde a las cadenas lineales de p-(NIPAM). En el caso de geles entrecruzados no hay estrictamente separación de fases sino contracción de la red en el intervalo

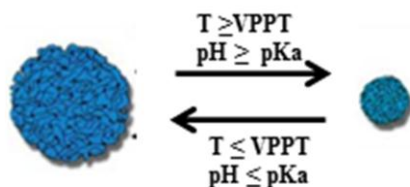


Figura 1.13 Esquema de la respuesta estimulada de los microgeles. Cuando la temperatura es mayor que VPPT o el pH es mayor que el pK_a del microgel, éste reduce su volumen, es decir, se colapsa.

de temperaturas marcado por las cadenas lineales. Por encima de la LCST el gel está contraído, las moléculas de agua son expulsadas de la red, y por debajo, expandido y se hincha de forma que los límites de variación de volumen vienen marcados por la existencia de la componenete elástica que es la que marca el límite para que el microgel no se disuelva completamente. Este cambio en el volumen (ver Figura 1.13) ocurre a una temperatura mayor de la temperatura de transición de fase de volumen (VPPT) y permite la liberación de las moléculas que se hubieran encapsulado de forma reversible, si fuera el caso.

1.4.2 Geles sensibles al pH

Los polímeros sensibles al pH son polielectrolitos con grupos ácido o básico que aceptan o ceden protones en respuesta a cambios en el pH del medio^[133].

Los grupos funcionales como los ácidos carboxílicos, el ácido fosfórico y las bases débiles como las aminas, muestran cambios en su estado de ionización bajo variaciones de pH (ver Figura 1.13). Esto conduce a un cambio conformacional del polímero soluble y a un cambio en el hinchamiento de los hidrogeles cuando los grupos ionizables están unidos a la estructura polimérica^[154]. Los monómeros clásicos son el ácido acrílico, el ácido metacrílico, anhídrido maleico, y N,N-dimetilaminoetil metacrilato. Pero también se han descrito polímeros que contienen derivados del ácido fosfórico^[145].

Los polímeros sensibles al pH se emplean en varias aplicaciones biomédicas, siendo la aplicación más importante su uso en sistemas de liberación de fármacos y sensores de glucosa^[155, 156]. El pH varía a lo largo del tracto gastrointestinal entre 2 (estómago) y 10 (colon), lo que ocasiona que los polímeros sensibles al pH sean ideales para la liberación de fármacos específicos del colon. La propuesta más común utiliza polímeros entéricos (ideales para el aparato digestivo), que resisten la degradación en medio ácido y liberan el fármaco en medio alcalino debido a la formación de la sal^[154].

Los microgeles sensibles al pH se utilizan con frecuencia en el desarrollo de formulaciones para la liberación controlada de fármacos con administración oral aprovechando las diferencias de pH entre la boca, el estómago (<3), el intestino y el colon. Los microgeles policatiónicos, por

ejemplo, se hinchan muy levemente a pH neutro, minimizando así la liberación del fármaco en el entorno neutro de la boca^[157, 158].

Los microgeles de polianiones (por ejemplo, el ácido poliacrílico) entrecruzados con azoaromáticos se desarrollaron para la liberación de fármacos específicos para el colon. En el estómago, su hinchamiento es mínimo pero aumenta a medida que el hidrogel pasa por el tracto intestinal debido al aumento del pH que conduce a la ionización de los grupos carboxílicos^[45]. Mohan, Y. y col.^[45, 159] investigaron el hinchamiento o dilatación de estos microgeles frente a diversos estímulos: pH, diferentes tensioactivos y disoluciones con polielectrolitos a diferentes temperaturas. Este trabajo describió la cinética del hinchamiento y las características de difusión del hidrogel en diferentes medios. La alta capacidad de hinchamiento y el equilibrio acuoso de estos microgeles hacen de ellos materiales idóneos para ser aplicados en bioingeniería.

Dado que en gran número de aplicaciones se utilizan polímeros con grupos cargados (polielectrolitos), describiremos brevemente algunas características de su comportamiento.

1.5 POLIELECTROLITOS

Los polielectrolitos son polímeros con grupos ionizables que en disolventes polares, como el agua, se disocian en cadenas de polímeros cargados y en contraiones. En disolución estos polímeros pueden adoptar distintas conformaciones desde la de ovillo aleatorio a la de cadena estirada, dependiendo de la naturaleza química del sistema polímero-solvente, de la temperatura y de la fuerza iónica de la solución^[159]. La solubilidad de los polielectrolitos viene dada por las interacciones con el disolvente, y por una ganancia muy grande de entropía cuando se liberan los contraiones.

Dependiendo de su origen se puede hablar de los polímeros naturales, como el ADN, polímeros naturales modificados, como puede ser la celulosa, y por último sintéticos, como puede ser el ácido poliestirensulfónico dependiendo de su origen.

En la Figura 1.14 se muestra la clasificación en términos de carga dispuesta en sus cadenas para unas condiciones de pH dadas, así los

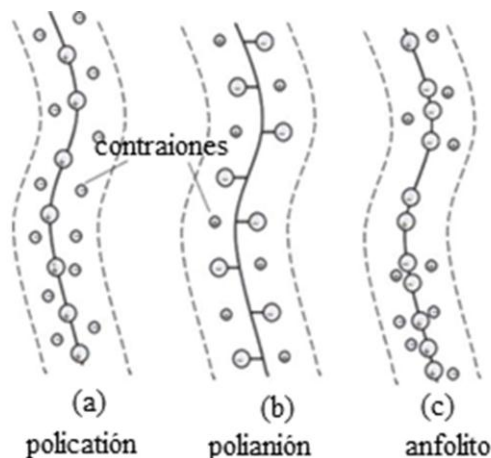


Figura 1.14 Clasificación de los polielectrolitos atendiendo a su carga: a) policationes, b) polianiones y c) anfolitos^[7].

polianiones poseen carga negativa, los policationes carga positiva, y polianfolitos que poseen ambas cargas y dependiendo de las condiciones del medio se comportan como policationes o polianiones. Por último, se puede hablar de una clasificación en función de la densidad de carga y acidez de los grupos funcionales. Al igual que se clasifican los electrolitos como fuertes o débiles, los polielectrolitos fuertes tienen todos sus iones completamente disociados y las cargas no pueden migrar o desplazarse a lo largo de la cadena, es decir, tienen alta densidad de carga. Por el contrario los polielectrolitos débiles tienen baja densidad de carga, donde la carga de los grupos químicos depende de condiciones externas, sea el pH o la fuerza iónica, por ejemplo^[160].

Las interacciones electrostáticas entre moléculas cargadas controlan gran diversidad de procesos a nivel biológico, de ahí el enorme interés que hay en estudio, tanto experimental como teóricamente^[149, 161, 162].

La forma teórica de tratar los polielectrolitos combina las leyes de la electrostática con la descripción estadística del medio líquido en el que los iones y moléculas se mueven.

Las interacciones entre dos polímeros neutros son en general de corto alcance y débiles. Sin embargo, un polielectrolito presenta además interacciones electrostáticas de largo alcance, que deben ser tenidas en cuenta ya que afectan a las propiedades conformacionales de los

polielectrolitos^[163]. Los modelos analíticos para explicar la distribución de la carga más conocidos son la teoría de Poisson-Boltzmann^[164] y la teoría de condensación^[165-167], y son el punto de partida para modelos numéricos más sofisticados.

De acuerdo con la teoría de condensación de Manning, se espera una condensación de contraiones sobre la cadena de polímero, lo que da lugar al apantallamiento de las cargas de ésta cambiando la conformación del polímero^[165]. Para la teoría de Manning, al igual que para la teoría de Poisson-Boltzmann, el disolvente es un continuo con constante dieléctrica, ϵ , los iones son cargas puntuales con una densidad, ρ , y densidad de carga, ξ , y el poli-ión se considera una línea de carga infinita caracterizada por el parámetro de carga

$$\xi = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 T_b} \quad (1.39)$$

siendo e la carga del electrón, ϵ la constante dieléctrica, ϵ_0 la constante dieléctrica en el vacío, T la temperatura y $b=1/N$ la distancia media entre las cargas del polímero.

El punto de partida de la teoría de Manning fueron las investigaciones desarrolladas por L. Onsanger^[168] en 1968 quien desarrolló las primeras ideas sobre condensación de iones. G. Manning, mostró que la densidad de carga de cadenas lineales de polielectrolitos no puede exceder un valor crítico. El valor crítico se alcanza ($\xi=1$) cuando la carga del polielectrolito se reduce condensando algunos contra-iones. Por otro lado, en las disoluciones de polielectrolitos se puede dar el fenómeno de asociación entre dos iones de carga contraria cuando la energía electrostática iguala a la energía térmica ($k_B T$). Por ello, se define la longitud de Bjerrum^[169] l_B , característica del disolvente, que es la distancia permitida para dos cargas electrostáticas elementales en un disolvente en equilibrio y por tanto se relaciona con la densidad de carga

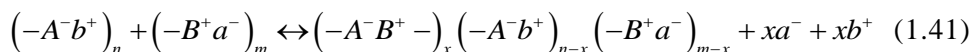
$$\xi = \frac{l_B}{b} \quad (1.40)$$

De acuerdo con la teoría de condensación de Manning, se puede decir que los contraiones empiezan a condensarse si $l_B \geq b$.

1.5.1 Complejos de polielectrolitos

En disolución, la interacción electrostática de tipo Coulomb entre polielectrolitos con carga opuesta, conduce a la formación de complejos de inter-polielectrolito. La formación de estos complejos está originada, principalmente, por la ganancia de entropía del sistema al liberar los contraiones retenidos en las cadenas.

Para formar un complejo de polielectrolitos, se mezclan disoluciones acuosas de polianión y policación. La formación del complejo vendría representada por el siguiente equilibrio:



del complejo formado, donde A^- y B^+ son los grupos con carga de los polielectrolitos y b^+ y a^- los contraiones; m y n son el número de grupos aniónicos y catiónicos

La razón de mezcla será igual a m/n o n/m y el grado de conversión se define como x/n cuando $n < m$ o x/m cuando $m < n$. Este grado de conversión dependerá del número de grupos iónicos enlazados entre los dos polielectrolitos, incluso con complejos estequiométricamente preparados se producen fenómenos conocidos como sobrecompensación de cargas.

También se forman complejos cuando uno de los polielectrolitos se encuentra adsorbido tanto sobre superficies planas como esféricas. La sobrecompensación de cargas es responsable de que sobre una capa adsorbida de un polielectrolito se adsorba una capa de polielectrolito de carga opuesta, proceso que puede repetirse hasta formar multicapas con numerosas capas de polielectrolitos, genera un espesor de cada bicapa característico de cada par de polielectrolitos estudiados y para unas condiciones dadas de pH, fuerza iónica y temperatura.

Esta formación de complejos inter-polielectrolito es la base de la técnica de adsorción alternada capa a capa que veremos más adelante. Es importante saber diferenciar entre dos conceptos que a partir de ahora se tratan: el complejo polielectrolito formado por un par de polielectrolitos, y la multicapa de polielectrolito que ocurre tras la adsorción sucesiva de polielectrolitos sobre una superficie cargada. La situación termodinámicamente más estable para un par de polielectrolitos es la

formación del complejo, si bien las multicapas son estructuras congeladas desde el punto de vista cinético.

Existen pocas aproximaciones teóricas para explicar la complejación de polielectrolitos. Para polielectrolitos débiles se utiliza como base la teoría de Deby-Hückel pero modificada por Castelnovo y Joanny^[170]. En esta teoría se considera que las fluctuaciones de carga para la formación de los complejos es pequeña y puede tratarse como un desarrollo truncado en el segundo orden de la energía libre, que es consistente siempre y cuando la fracción de los monómeros cargados en los dos polímeros que forman el complejo es pequeña. Los complejos en disolución se encuentran formados al menos por cinco componentes, el disolvente, los dos polímeros a concentraciones c^+ y c^- , y los respectivos contraiones en la disolución de concentraciones n^+ y n^- , considerando como contraiones todos los pequeños iones que se encuentran en la disolución incluidos los que provienen de las sales añadidas. Aparece por tanto como única limitación la electroneutralidad $n^+ c^+ = n^- c^-$. Como simplificación para el estudio aquí planteado, se consideran polímeros, N con igual número de monómeros cargados f y con la misma concentración $c^+ = c^- = c$ y $n^+ = n^- = n$.

Los resultados que se obtienen son similares a los que se obtienen con la teoría estándar de Debye-Hückel; Las diferencias en la presión osmótica entre el complejo y la fase diluida se expresa

$$\Pi_{el} = -\frac{k_B T}{\xi^3} \quad (1.42)$$

donde ξ es la longitud de la correlación electrostática. En el equilibrio la presión osmótica debe ser igual en ambas fases quedando la concentración del complejo definida por:

$$c_{compl} \approx \frac{f^2}{a^2 n w^{\frac{3}{4}}} \quad (1.43)$$

donde w hace referencia a la estequiometría del complejo. Cuando N es pequeño, la entropía traslacional de las cadenas se incluye para el orden de interacción electrostática atractiva y la formación de complejos solo se producirá cuando

$$\frac{n^2 a^2 w^{3/4}}{f^4} \leq 1 \quad (1.44)$$

Si el peso molecular es demasiado pequeño o la fracción de monómeros cargados demasiado baja, la mezcla de polielectrolitos de distinta carga es soluble en agua.

1.5.2 Capas de polielectrolitos. Sobrecompensación de cargas

Los modelos teóricos utilizados para describir la interacción de polielectrolitos con partículas coloidales ayudan a entender los fenómenos que aparecen cuando experimentalmente se ponen en contacto.

Ya se ha mencionado que la cantidad de polielectrolito adsorbido depende, entre otros factores, de la flexibilidad de las cadenas de polielectrolito y de la densidad de carga de la superficie que se recubre. Existen aproximaciones teóricas para describir la sobrecompensación^[171].

Para la mayor parte de poliones, la relación entre el espesor y el número de capas es lineal^[31], aunque en el caso de la primera capa, ésta siempre dependerá del sustrato utilizado. Después de un número determinado de capas, el crecimiento alcanza un régimen estacionario independiente del sustrato^[172].

Cuando el crecimiento que se produce es exponencial se relaciona con la rugosidad de la superficie^[173]. A medida que aumentan las capas, la rugosidad aumenta y con ello el área y las cargas disponibles para la adsorción. Visiones recientes han asociado este tipo de crecimiento a que se produce una reorganización interna de las multicapas^[174]. Esta reorganización interna provoca que entre las cadenas de los distintos polímeros no se de una interfase clara, de acuerdo a la teoría de las capas difusas^[29], tal y como se muestra en la Figura 1.15.

Los modelos teóricos planteados hasta ahora consideran solo la interacción entre capas adyacentes. Schlenoff y Dubas^[175] describieron la adsorción en términos de la distribución de segmentos poliméricos considerando dos parámetros: la sobrecompensación y la longitud de la multicapa, mostrando así el exceso de la última capa.

Para cadenas flexibles, J.F.Joanny^[176] empleó el método del campo autoconsistente para describir la adsorción de una cadena de un polielectrolito débil: en un medio de fuerza iónica baja, encontró que la

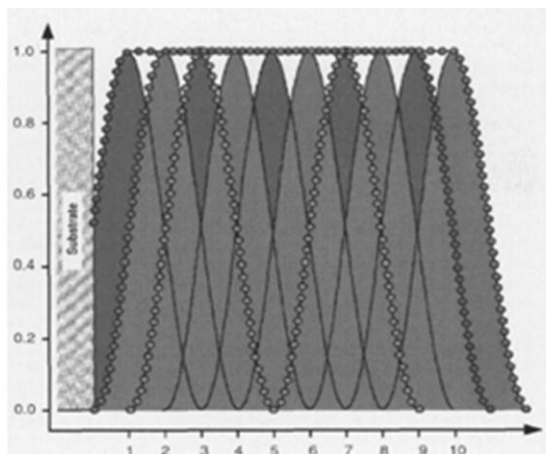


Figura 1.15 Modelo de capas difusas: Las multicapas están representadas por un perfil de concentración de carácter sinusoidal (líneas negras) elegido arbitrariamente. Para un sustrato con carga positiva, las curvas más oscuras corresponden a las capas de polianión y las curvas más claras corresponden a las capas de policación.

sobrecompensación se daba, pero que era poco significativa. Según esta teoría unos pocos segmentos de cadena se extienden a lo largo de la dirección z , perpendicular a la superficie, siendo éstos los responsables de la sobrecompensación de la carga.

Por otro lado, J.F.Joanny^[176] encontró que en el límite de alta fuerza iónica, además de las repulsiones entre los segmentos de una misma cadena se producen fuertes interacciones atractivas de esos mismos segmentos con la superficie. Como consecuencia, la adsorción en estas condiciones de fuerza iónica no está dominada por la interacción electrostática, sino que es dirigida por un potencial atractivo de corto alcance. En este momento las cadenas comienzan a ser más flexibles, provocando la sobrecompensación de la carga^[29].

Una forma de ver el proceso de adsorción-complejación de las películas poliméricas es a través de la dependencia del proceso con el tiempo^[177, 178]. La cinética que habitualmente se observa se divide en dos etapas, la primera se da en pocos segundos y la segunda más lenta. La primera etapa implica el transporte de las cadenas a la superficie y una deposición rápida donde la razón de deposición queda determinada por la difusión de las cadenas hasta que una repulsión las detiene^[178, 179]. Después, en la segunda etapa pueden

ocurrir reorganizaciones superficiales que permite la difusión de las cadenas a la zona interna de la multicapa conduciendo a una complejación irreversible de cargas a una velocidad más lenta hasta que se alcance la saturación^[178, 180].

1.5.3 Técnica capa a capa (LbL)

La técnica capa-a-capas (LbL) se basa en la adsorción de polímeros con carga opuesta sobre materiales cargados. Las ventajas de esta técnica con respecto a otras metodologías conocidas para la preparación de películas delgadas, tal como el autoensamblaje de una monocapa (SAM)^[181] o el ensamblaje Langmuir^[76]-Blodgett^{[182],[183-185]} son su versatilidad y simplicidad; con una instrumentación muy sencilla es posible formar estructuras complejas de forma reproducible y con alta estabilidad.

El origen de esta técnica puede encontrarse en el trabajo de Iler, quien en 1966 informó de la deposición secuencial de partículas coloidales sobre sustratos sólidos^[13]. En 1991, Decher y Hong^[186] demostraron que los polielectrolitos pueden ser ensamblados^[177] sobre superficies sólidas de forma secuencial, estableciendo las bases para un rápido desarrollo de la técnica. El procedimiento consiste en la adsorción alternada de especies con múltiples cargas catiónicas o aniónicas sobre superficies macroscópicas cargadas, observándose que cada paso de adsorción conduce a la inversión de la carga superficial, y que una serie de deposiciones consecutivas conducen a un complejo estructurado en capas^[187]. El espesor de una bicapa de polielectrolitos y las propiedades fisicoquímicas de la película se ven influenciados por parámetros como el pH, fuerza iónica, temperatura, polaridad del disolvente, los cuales pueden controlarse ajustando las condiciones experimentales^[171, 188].

Desde esta propuesta inicial^[189] el método LbL ha progresado espectacularmente en el campo de la investigación de materiales nanoestructurados ya que el recubrimiento realizado es muy estable^[190]. Por ello, existen muchas líneas de investigación en las que se describen el ensamblaje de nanopartículas, cristales, proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y una amplia variedad de materiales funcionales. En la actualidad, no sólo las fuerzas electrostáticas^[175, 191, 192] intervienen en el proceso de ensamblado, sino que se están utilizando otro tipo de fuerzas de

unión, como son los enlaces de hidrógeno, enlaces covalentes u otro tipo de interacciones^[193, 194].

Numerosos estudios han demostrado que las biomoléculas y otras especies biológicamente importantes pueden ser incorporados dentro de las multicapas y siguen manteniendo o mejorando sus funciones biológicas. Algunos ejemplos incluyen la inmovilización de ácidos nucleicos, vesículas lipídicas, polipéptidos y diferentes proteínas bioactivas en el campo de la medicina^[190].

Experimentalmente, el proceso de adsorción de los polielectrolitos en disolución acuosa sobre partículas coloidales se lleva a cabo con el mismo procedimiento aplicado a sustratos macroscópicos planos^[184] y se ilustra en la Figura 1.16.

Para partículas coloidales aparecen algunas complicaciones adicionales: tras la adsorción de la primera capa de polielectrolito sobre la partícula, hay que separar las partículas recubiertas de las que no lo están. También es necesario eliminar el exceso de polielectrolito que no fue depositado antes

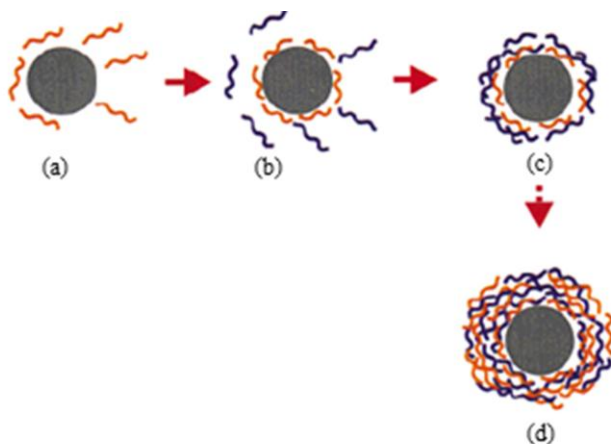


Figura 1.16 Técnica LbL. a) Sobre una partícula se deposita un polielectrolito por interacción electrostática. (b) El polielectrolito de carga contraria es depositado sobre la primera capa formada. (c) El exceso de materia no adsorbida se elimina mediante ciclos de centrifugación antes del siguiente ciclo de adsorción. (d) Repetición de los pasos llevados en (a) y en (b) por la exposición repetitiva a polielectrolitos de carga alterna dando lugar a multicapas adsorbidas sobre la partícula^[29, 31].

del siguiente paso de adsorción, de lo contrario se formarían complejos inter-poliectrolitos en la disolución. Por todo ello, es necesario, tras la adsorción de la primera capa la disolución se centrifuga al menos tres veces para asegurarse la eliminación del exceso de polielectrolito y las partículas sin recubrir^[30, 190].

Una gran ventaja de la adsorción LbL desde una disolución, es que muchos materiales diferentes se pueden incorporar como películas individuales, estando la estructura resultante determinada completamente por la secuencia de deposición^[195, 196].

Para caracterizar el crecimiento de las multicapas se suele monitorizar el cambio de carga y tamaño de cada capa en cada ciclo de adsorción. La adsorción de un polielectrolito sobre una superficie coloidal produce gran cantidad de cambios en dicha superficie, de forma que la descripción del crecimiento de las multicapas debe distinguir entre la primera capa formada entre la superficie coloidal y el polielectrolito, y las sucesivas multicapas formadas entre polielectrolitos. Existen estudios en los que se compara la adsorción de polielectrolitos en sustratos planos y esféricos en diferentes condiciones de pH, disoluciones de polímeros y concentración de los mismos^[41, 197-201].

La técnica más idónea que permite de forma cualitativa observar la adsorción de los polielectrolitos es la medida del potencial zeta de cada una de las capas adsorbidas. Así los valores de potencial zeta cambian desde valores positivos a negativos según sea polianión o policación el polielectrolito adsorbido^[30, 202].

Desde el punto de vista cinético en sustratos macroscópicos, la adsorción se puede dividir en dos etapas, una primera etapa rápida (minutos) en la cual, se produce el transporte de las cadenas de polielectrolito hasta la superficie de la partícula recubierta donde la cantidad depositada será directamente proporcional a la facilidad de difundir de las cadenas de polímero; y una segunda etapa, mucho más lenta que la anterior, que consiste en un proceso de reorganización de las cadenas que puede implicar la difusión de algunos segmentos hacia las capas internas. Este proceso vendrá más o menos impedido en función de la rigidez del polielectrolito y esto es lo que da lugar la formación de complejos inter polielectrolito en la superficie^[177-180].

Hay que tener en cuenta que las disoluciones de polielectrolitos añadidas deben tener siempre la misma fuerza iónica^[203] y concentración del polielectrolito para que las capas formadas tengan un mismo patrón. De hecho es posible observar diferentes tipos de crecimientos de multicapas para un par de polielectrolitos al cambiar la fuerza iónica^[204].

En la formación de multicapas, la primera capa es la que mayor influencia tiene del sustrato sobre el que se adsorbe pero a medida que aumenta el número de capas, el crecimiento se vuelve independiente del sustrato utilizado y se puede observar un espesor repetitivo en cada capa sucesiva^[30, 172], siempre que el crecimiento no sea exponencial.

En la adsorción de polielectrolitos de carga contraria las interacciones electrostáticas son la base de la adsorción pero esta adsorción puede favorecerse por contribuciones de otras fuerzas como pueden ser de Van der Waals, ácido-base o enlaces de hidrógeno^[175, 191, 192].

En la actualidad, la técnica LbL ha sido aplicada con éxito en la formación de capas con polielectrolitos en los que se combinan la interacción electrostática y reacciones químicas entre las cadenas de los polielectrolitos^[190]. Así la formación de las capas puede seguir un modelo más controlable aumentando de este modo las aplicaciones de esta técnica en mayor número de campos en la medicina y en la industria.

Por ejemplo, la química del enlace covalente está dando paso a nuevos sistemas más estables en el desarrollo de cápsulas poliméricas o la incorporación de propiedades ópticas a las multicapas formadas para la fabricación de diodos emisores de luz^[205].

1.5.4 Polielectrolitos funcionalizados

En la actualidad, existe un creciente interés en los polielectrolitos sintéticos biocompatibles con cadenas funcionalizadas. La industria busca polielectrolitos que permitan la formación de capas con una estructura más organizada y controlada y para conseguir este objetivo se suele introducir en los polielectrolitos un número controlado de cadenas modificadas con grupos funcionales. Con este tipo de polielectrolitos se combina la sobrecompensación de cargas y la formación de enlaces entre los grupos químicos de las cadenas dando lugar a recubrimientos con mayor estabilidad.

Hace un par de décadas, Hoyle^[206] aplicó por primera vez la química de la tiolización de polímeros y la extendió a otros materiales.

Para aplicaciones farmacéuticas, principalmente en liberación controlada de fármacos, se ha utilizado la reacción reversible tiol-sulfuro que es fácilmente controlable. Algunas investigaciones ya aplicaban esta técnica para estabilizar cápsulas de polipéptidos bajo condiciones altamente ácidas, pero no fue hasta 2001 cuando se fabricaron por primera vez cápsulas con multicapas unidas por enlaces de hidrógeno y entrecruzadas a través de puentes disulfuro, que son muy estables a pH fisiológico y sobre todo, reversibles. Esto permite tener un muy buen control de la destrucción de las capas incluso en el interior de una célula.

Hay muchos tipos de polímeros funcionalizados con el objetivo de crear estructuras que sirvan de plataforma para aplicaciones biomédicas. Uno de ellos es el ácido polimetacrílico modificado con grupos tiol(PMA_{SH})^{[207],[208]} que se utiliza en la formación de cápsulas poliméricas en las que sus multicapas se forman por enlaces de hidrógeno entre polivinilpirrolidona (PVP) y PMA_{SH} formando disoluciones moderadamente ácidas. El ensamblaje debe hacerse a pH 4 debido a que a este pH las moléculas de ambos polielectrolitos están más disociadas, y por tanto la interacción entre ellos es más efectiva. Cuando el sistema se somete a las condiciones en que los grupos tiol dan lugar a puentes disulfuros, las cadenas de PMA quedan entrecruzadas (Ver Figura 1.17), se rompen los enlaces de hidrógeno entre PMA_{SH} y PVP, y ésta difunde fuera de la multicapa. Este es un paso esencial

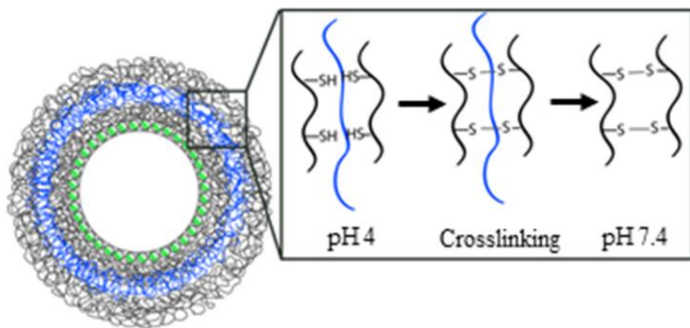


Figura 1.17 Ensamblaje de los capsosomas PMA_c/(DMPC/DPPC)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)_x. Transformación de los enlaces de hidrógeno en puentes disulfuro por cambio de pH^[13].

en la formación de estas cápsulas ya que proporciona estabilidad en condiciones fisiológicas, y al mismo tiempo es una reacción reversible pero controlable para liberar el material que se hubiera encapsulado^[209]. La facilidad de formar los enlaces de hidrógeno en condiciones reductoras (pH 5) las hace ideales para liberación de fármacos^[208], y este tipo de cápsulas están siendo empleadas, debido a su similitud con la estructura de las células con péptidos, vacunas o depósitos de fármacos para su posterior liberación debido a su nula toxicidad y biodegradabilidad.

Otros grupos de investigación han desarrollado multicapas basadas en enlaces de hidrógeno a partir del ácido policarboxílico utilizando reacciones de amidación, que mejora su estabilidad a pH 6 ó pH 7. Presentan una gran estabilidad en un amplio margen de condiciones, incluso en presencia de sérum y proteínas, y se degradan en presencia de un agente reductor que existe en la naturaleza, glutatona (GSH), lo que confirma su naturaleza biodegradable.

Otra funcionalización que se ha introducido en poli-lisina (PLL), PVP y PMA han sido ramificaciones de colesterol, poli-lisina-co-colesterol (PLL_c), polivinilpirrrolidona (PVP_c), poli-(ácido metacrílico)-co-colesterol metacrilato (PMA_c) mostrado en la Figura 1.18, que se acoplan a la cadena del liposoma mediante enlaces no covalentes y facilitan el ensamblamiento de liposomas al polímero. El colesterol es una cadena lipídica natural cuyo

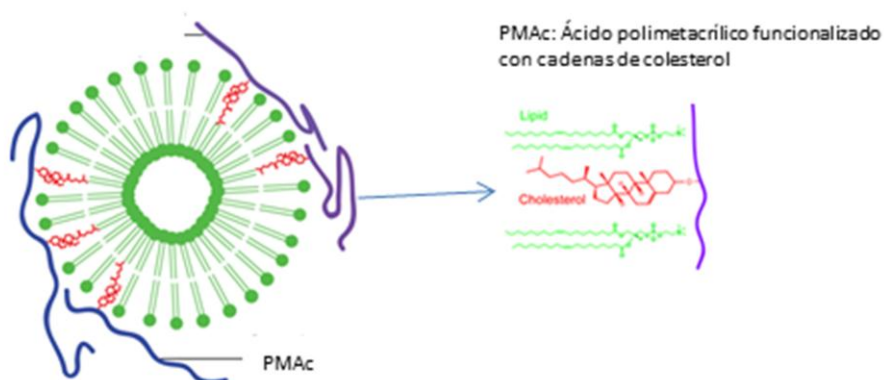


Figura 1.18 Estructura que adopta el polímero funcionalizado PMA_c cuando se adsorbe sobre un liposoma^[11].

interés radica en que se incorpora al liposoma rápidamente y es insensible al pH y a la fuerza iónica. De esta forma, se pueden ensamblar liposomas entre una capa precursora, PLL_c y una capa denominada de "capping" porque evita que los liposomas se vayan de la estructura, como el PMA_c o poli-(ácido metacrílico)-co-colesterol metacrilato.

1.6 INTRODUCCIÓN A LAS CÉLULAS ARTIFICIALES

El desarrollo de estructuras para poder subdividir el espacio disponible de una manera controlable en diferentes subunidades en la escala nanométrica ha sido siempre un gran reto para los científicos. La compartimentalización es una de las técnicas adoptadas por las células para alcanzar un elevado nivel de control sobre procesos (bio)químicos a la vez que el subcompartimento sirve también para proteger a la célula de la acción degradadora de sus contenidos (por ejemplo en el caso de los lisosomas)^[42]. Las células eucariotas desarrollaron esta estructura como una exitosa alternativa para optimizar los procesos físicos y químicos utilizando únicamente una bicapa lipídica. El uso de múltiples compartimentos, cada uno encerrado por una bicapa lipídica diferente, ha demostrado ser una buena manera de separar las diferentes funciones celulares protegiendo al mismo tiempo sus importantes contenidos internos de los alrededores^[210, 211].

El tratar de mimetizar este complejo entramado arquitectónico de orgánulos en el interior de una célula eucariótica ha llevado al desarrollo de los "capsosomas" un tipo de estructura con multi-compartimentos que consiste en vesículas unilamelares atrapadas en una capsula polimérica^[212] (Ver Figura 1.19). Este tipo de arquitecturas multi-vesiculares representan una estructura bien controlada con potencial uso en aplicaciones biomédicas.

De la misma manera que los órganos artificiales y la ingeniería de tejidos han dado literalmente una nueva vida a sistemas macroscópicos vivos, se espera que la creación de células artificiales sirva para la sustitución ante la

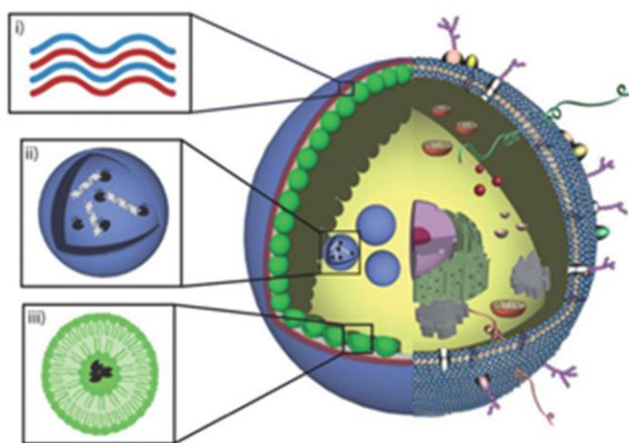


Figura 1.19 Comparación de una célula con la estructura de un capsosoma. i) Multicapas poliméricas que dan lugar a la membrana biológicamente biodegradable, ii) Incorporación de lisosomas para la degradación de ADN y iii) Liposomas cargados con un fármaco hidrofóbico en su interior^[17].

pérdida o el mal funcionamiento de una función celular^[15]. Los capsosomas son una herramienta eficiente de encapsulación para mimetizar entornos biológicos sin causar daño a los materiales frágiles de la célula y también tienen un posible uso en el campo de los *drug delivery systems*^[213] (sistemas liberadores de fármacos) o como micro-reactores^[214].

Mientras que el interés hacia los liposomas ha sido motivado por su biocompatibilidad y similitud con las membranas celulares, la cápsula de naturaleza polimérica aprovecha sus propiedades de permeabilidad únicas, las cuales le permiten la retención de material biológico como proteínas y otros biopolímeros mientras que otros sustratos de pequeño peso molecular pueden permear fácilmente dentro y fuera de las paredes, haciendo de estas micro-cápsulas candidatos particularmente atractivos como vehículos transportadores o *carriers* de reacciones bio-catalíticas.

La primera generación de capsosomas consistió en la incorporación de liposomas insaturados, zwitteriónicos y de un tamaño aproximadamente de unos 50 nm a una membrana polimérica no-biodegradable formada por el par de polímeros poliestireno sulfonato sódico (PSS) y hidrocloreuro de polialilamina (PAH) los cuales interactúan entre sí mediante interacciones electrostáticas^[17, 214]. La funcionalidad de los capsosomas también ha sido

demostrada por medio de una reacción enzimática cuantitativa utilizando la enzima β -lactamasa encapsulada en los liposomas situados en el interior de la cápsula polimérica^[17]. Los capsosomas son de gran interés debido a que la capsula polimérica posee cierta permeabilidad, mientras los liposomas dividen el interior de la capsula en sub-compartimentos, de manera que teóricamente sería posible realizar reacciones enzimáticas en cadena en su interior de manera paralela.

Otra posible aplicación de estos capsosomas sería como sistemas administradores de fármacos, puesto que los liposomas pueden encapsular tanto materiales hidrofóbicos como hidrofílicos, así que serían de gran utilidad para la administración de fármacos complementarios.

Los orgánulos artificiales se podrían definir como pequeños sistemas (de tamaño sub-celular) de encapsulación que combinan diferentes moléculas para crear funciones celulares complejas con los mínimos componentes. En esta tesis, se describe el diseño de orgánulos artificiales basados en nano-liposomas y nanocápsulas poliméricas integrados en una cápsula polimérica de tres micras de tamaño. La fabricación de orgánulos artificiales parece estar indicada para aplicaciones biomédicas tales como el reemplazamiento de una enzima en una enfermedad genética o hablando de una manera más general, para añadir en una célula la funcionalidad bioquímica deseada. Sin embargo, para sustituir a la función celular, las reacciones deben ocurrir repetidamente y en forma de cascada, por lo que deben existir múltiples compartimentos que contendrán diferentes enzimas. Además, no solo las moléculas atrapadas en los compartimentos, sino también la selectividad asociada a cada uno de ellos deben ser tenidos en cuenta para simular la biofuncionalidad de las células biológicas.

Las primeras investigaciones del grupo de F. Caruso^[214] comenzaron con el ensamblaje de más capas de liposomas separadas por capas poliméricas y todo ello formando parte de una membrana polimérica y biodegradable, y el estudio del comportamiento de los liposomas cuando se cargan con pequeñas moléculas hidrofóbicas que incluye su estabilidad y liberación.

1.6.1 Híbridos con compartimentos poliméricos y liposomas

Los híbridos que se muestran en la Figura 1.20 se desarrollan como un paso más en las aplicaciones que se han mostrado para los capsosomas.

En los híbridos, la construcción de cápsulas de naturaleza polimérica que contienen nanocápsulas y liposomas en su interior, son una nueva estructura hacia la construcción de células artificiales. En el capítulo de Materiales y métodos se presentan los aspectos fundamentales que se encuentran detrás de la construcción de híbridos y basados en los capsosomas, los denominados híbridos inversos.

Por primera vez se describe la encapsulación de una capa de nanocápsulas no degradables y una capa de liposomas en el interior de una cápsula polimérica bio-degradable. La encapsulación de las nanocápsulas se consigue por ensamblaje electrostático sobre partículas de sílice; y la unión de los liposomas se consigue gracias a la unión no covalente de los liposomas con polímeros modificados con diversas unidades de colesterol, tales como la polilvinilpirrolidona y el ácido polimetacrílico (Ver Figura 1.21).

Se han realizado numerosos experimentos con el fin de seleccionar la combinación de polímeros más adecuada para incorporar la máxima cantidad de liposomas. Las cápsulas poliméricas se forman depositando alternadamente dos diferentes polímeros que interactúan entre sí mediante enlaces de hidrógeno, poli-(N-vinil pirrolidona) (PVP) y ácido poli(metacrílico) modificado con grupos tiol (PMA_{SH}). Una vez disuelto el interior de las partículas, se obtienen unos sistemas muy estables^[11].

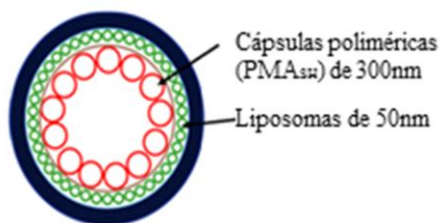


Figura 1.20 Híbridos formados por cápsulas poliméricas de 300 nm y liposomas de 50 nm y ambos recubiertos por cuatro bicapas de polímeros.

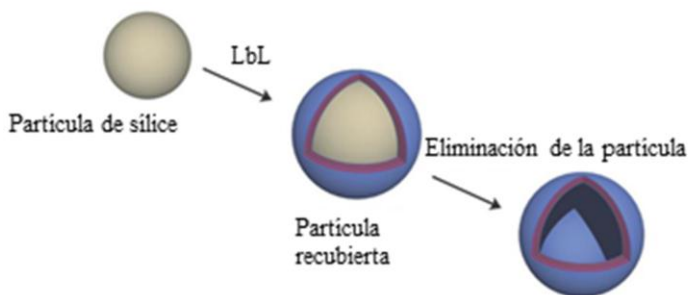


Figura 1.21 Obtención de una cápsula polimérica: LbL aplicada sobre una partícula de sílice utilizando el par de polielectrolitos $\text{PMA}_{\text{SH}}/\text{PVP}$ y eliminación de la partícula con tratamiento de ácido y lavado posterior para mantenerlas a pH fisiológico^[15].

El ensamblaje en los híbridos comienza con la deposición de una capa precursora denominada de sacrificio pues sirve de separación entre la plantilla coloidal, seguido de la incorporación de liposomas y capas de polímero como separación. Después de adsorber la capa de bloqueo que no permite la liberación de los liposomas durante el proceso de ensamblaje, y de adsorber las cápsulas poliméricas, se depositan más capas poliméricas que dan lugar a una macroestructura formada por diferentes compartimentos. Una vez formada la estructura se elimina la plantilla coloidal mediante un tratamiento con ácido que será bastante más suave que el realizado en los capsosomas por su mayor complejidad.

Estas estructuras permiten dos tipos de estructuras para la liberación de carga que puedan tener en las cápsulas poliméricas o en los liposomas. En el caso de la encapsulación de enzimas y sustratos en el interior de los liposomas, la temperatura, el pH y/o la adición de un tensioactivo controlarán la reacción enzimática; en el caso de nanocápsulas poliméricas será la degradación de las mismas mediante la adición de algún agente que rompa los enlaces formados y se libere la carga del interior^[215, 216].

Estos sistemas son el principio del desarrollo de esta clase de híbridos. Se pueden plantear variantes como puede ser el tipo de liposoma utilizado, nanocápsula polimérica e incluso diferentes polielectrolitos en busca de otras aplicaciones. Combinando los resultados obtenidos para híbridos con los obtenidos para los capsosomas se puede asegurar cierta estabilidad frente cambios en el entorno, y abre la puerta para futuras mejoras^[217].

1.7 OBJETIVOS DE LA TESIS

Uno de los objetivos importantes de esta tesis ha sido la fabricación de vesículas unilamelares pequeñas monodispersas, de un radio aproximadamente de 100 nm y su recubrimiento, con la técnica capa a capa, con polielectrolitos y nanopartículas de distinta naturaleza. Se han preparado liposomas con diferentes composiciones lipídicas, centrándonos principalmente en un profundo estudio de liposomas de carácter catiónico formado por 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DOPC) y el tensioactivo catiónico bicationario bromuro de dimetildioctadecilamonio (DODAB) con distintas densidades de carga. Otros fosfolípidos utilizados han sido 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (en sal sódica), (DOPS), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina (en sal sódica), (DPPC), y las combinaciones entre ellos fueron DMPC: DPPC, DOPC: DOPS para conseguir liposomas saturados e insaturados, respectivamente con carga negativa. Estos liposomas presentan estructuras, propiedades y estabilidad que son independientes de las variaciones de pH, temperatura y fuerza iónica, y son por tanto plantillas ideales en procesos de recubrimiento capa a capa.

Una vez estudiados estos sistemas plantilla y optimizados los métodos de fabricación, se han realizado recubrimientos capa a capa con distintos pares de polielectrolitos. Inicialmente se han utilizado los pares poli-estirensulfonato sódico/poli-alilamina (PSS/PAH) y poli-estirensulfonato sódico/poli-cloruro de dialil-dimetilamonio (PSS/PDADMAC); en el primero, el ensamblaje se debe a interacciones electrostáticas combinadas con ácido-base, mientras que en el segundo la interacción es puramente electrostática. También se ha utilizado el par de polielectrolitos biocompatibles poli-L-lisina/poli-L-glutámico ácido (PLL/PGA). Adicionalmente se han utilizado en los recubrimientos nanopartículas de látex cargadas y polímeros cuyas características responden a estímulos tales como pH o temperatura.

Otro de los objetivos de esta tesis ha sido la fabricación y caracterización de microgeles, sensibles a pH y temperatura, recubiertos de polielectrolitos

por la técnica de capa a capa. Se han preparado microgeles de PNIPAM entrecruzados con 1-Vinil-imidazol (VI) lo que añade a la sensibilidad a la temperatura típica de los microgeles de PNIPAM sensibilidad al pH. Estos microgeles han sido recubiertos con el par de polielectrolitos independientes del pH poli-estirensulfonato sódico/poli-cloruro de dialil-dimetilamonio (PSS/PDADMAC) estudiados con dos fuerzas iónicas distintas, 0.1 M NaCl y 0.25 M NaCl y con el par de polielectrolitos biocompatibles PGA/PLL en disolución tamponada por ser dependientes del pH. Los estudios desarrollados sobre estos nuevos sistemas se centraron en observar cómo afectaba la temperatura al tamaño y a la movilidad electroforética con medidas de ambos parámetros en los diferentes entornos creados.

Adicionalmente se han preparado liposomas recubiertos con Poli-(N-isopropilacrilamida), con cadenas de ácido carboxílico en posiciones terminales (p-(NIPAM)-COOH) para inferir al liposoma un control de temperatura y posteriormente se ha recubierto con una capa de poli-etilenglicol con terminaciones amina (PEG-NH) lo que le proporciona biocompatibilidad. Dada la baja densidad de carga de ambos polielectrolitos se ha utilizado una reacción de condensación para que ambos polielectrolitos queden adsorbidos recubriendo el liposoma. Una vez alcanzada la respuesta a la temperatura alcanzada y biocompatibilidad se caracterizó el efecto de la misma sobre el tamaño y sobre la movilidad electroforética antes y después de la temperatura de transición que caracteriza al fosfolípido de partida, DPPC.

Otro objetivo importante ha sido la puesta a punto y el estudio de de microestructuras (híbridos, híbridos inversos y capsosomas) que funcionan como microcontenedores-reactores, mimetizando el comportamiento de las células. Los híbridos y los híbridos inversos basan su estructura en la que se desarrolló para los capsosomas pero en este caso se realiza la adsorción de una capa de nanocápsulas no degradables y una capa de liposomas en el interior de una cápsula polimérica bio-degradable donde la adsorción ha tenido lugar mediante la combinación de la técnica capa a capa por adsorción electrostática y la aplicación de una reacción de entrecruzamiento que tiene lugar entre los grupos tioles de uno de los polielectrolitos adsorbidos, PMA_{SH} , transformando los enlaces $-\text{SH}$ en enlaces disulfuro más estables. La diferencia entre los híbridos y los híbridos inversos es principalmente la capa inicial que en el caso de los híbridos son nanocápsulas poliméricas y en el caso de los híbridos inversos son los liposomas la primera capa adsorbida sobre las partículas de látex.

Por último, otro de los objetivos de esta tesis ha sido el estudio de la funcionalidad de estos sistemas. Se han encapsulado dos tipos de fármacos, Dextrano (DEX) y Doxorubicina (DOX) y una reacción enzimática Nitrocefina/ β -lactamasa. La liberación de la enzima encapsulada produce la reacción del sustrato, nitrocefina, que puede seguirse colorimétricamente después de liberarse la enzima por la degradación de los liposomas. En el caso del DOX, introducido en los liposomas, la liberación de este provoca un aumento de fluorescencia en la disolución en la que se encuentran inmersos tras aumentar la temperatura hasta sobrepasar la temperatura de transición del fosfolípido. Del mismo modo que para el DOX, el DEX fue introducido en los liposomas siguiendo la fluorescencia pero la diferencia radica en la localización del fármaco dentro de los liposomas que para el caso del DEX fue el interior del liposoma y para el DOX fue dentro de la bicapa lipídica.

2 TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1 TÉCNICAS DISPERSIVAS

Las técnicas dispersivas son una herramienta eficaz para determinar características de la materia. Se hablará de diferentes técnicas dispersivas: de luz, rayos X y neutrones, y la información que se obtiene se considera complementaria ya que los resultados derivan de la dispersión a distinta longitud de onda. De forma general, la intensidad de luz dispersada puede expresarse:

$$I(q) [cm^{-1}] \approx \frac{n}{V_{bicapa}} P(q) S(q) \quad (2.1)$$

donde n es el número total de partículas en la muestra, V el volumen de la muestra, $P(q)$ es el factor de forma de la partícula y $S(q)$ es el factor de estructura. La relación n/V_{bicapa} puede expresarse como F/V_{bicapa} donde F es la fracción en volumen de los lípidos de la muestra y V_{bicapa} el volumen total de la bicapa de una vesícula.

Esta relación es la que se analizó en todas las técnicas aquí presentadas y que en función de la radiación electromagnética que se disperse se resolvió con diferentes métodos.

2.1.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Fundamentos

La dispersión de luz se encuentra dentro del amplio conjunto de técnicas experimentales basadas en la interacción radiación-materia. El campo electromagnético de la luz incidente induce un momento dipolar oscilante en las moléculas del medio. La luz irradiada por el *dipolo*, que se denomina luz dispersada o difundida, tiene la misma frecuencia que la radiación incidente (ω_i) y una intensidad mucho menor, típicamente 10^{-4} a 10^{-6} veces menor.

Los fundamentos teóricos de la dispersión de la luz se basan en la teoría de Dispersión de Rayleigh^[218] desarrollada en 1881, que al aplicar a partículas pequeñas y esféricas no varía la frecuencia en la dispersión de la luz. Posteriormente Debye^[219] aplicó la dispersión de luz a partículas más grandes y no esféricas y ya en 1909 se planteó la dispersión de Mie^[220], válida para partículas esféricas de tamaño muy superior a la longitud de

onda y con índice de refracción complejo. Smoluchowski^[221] (1908) y Einstein^[222] (1910) desarrollaron una teoría en la que no se considera explícitamente la estructura molecular sino las fluctuaciones del índice de refracción^[223].

El método de dispersión de luz dinámica, también conocido como dispersión cuasi-elástica de luz (QELS)^[224] o Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS) permite obtener información dinámica (coeficiente de difusión, velocidad,...) sobre las partículas que se mueven al azar (movimiento Browniano). La luz dispersada por una disolución polimérica o coloidal contiene información sobre la estructura, interacciones y dinámica de las macromoléculas o coloides. Es por eso que la dispersión de luz es una de las técnicas más ampliamente empleadas para la caracterización de polímeros y coloides en disolución.

En 1930 Gross obtuvo por primera vez el espectro de la luz difundida por un líquido. Donde además del doblete predicho por Brillouin en 1914, mostraba la existencia de una banda central denominada Rayleigh con su máximo centrado en la frecuencia de la radiación incidente.

El fenómeno físico que produce la dispersión de luz es la interacción de la radiación electromagnética con la materia. La Figura 2.1 muestra cómo se produce. Los campos eléctrico y magnético que componen la radiación oscilan con la misma frecuencia, ω_i . Como el efecto del campo magnético sobre la materia es mucho menor que el del eléctrico se puede despreciar el primero. El campo eléctrico incidente, \vec{E}_i , desplaza las cargas de la molécula creando en ella un dipolo inducido, μ :

$$\mu = \alpha \vec{E}_i \quad (2.2)$$

donde α el tensor de polarizabilidad de la molécula. Dado que el campo eléctrico oscila con una frecuencia ω_i , el dipolo también lo hace. Un *dipolo oscilante* emite radiación en todas direcciones y es a esta radiación a lo que se denomina *dispersión Rayleigh*^[218].

En la Figura 2.1 se esquematiza un experimento de dispersión de luz. El plano de dispersión viene definido por el rayo incidente y el dispersado, entre los que se forma un ángulo θ . El campo eléctrico de la radiación incidente está representado por un vector perpendicular al plano de dispersión, su expresión en un punto cuyo vector de posición es \vec{r} viene dada por:

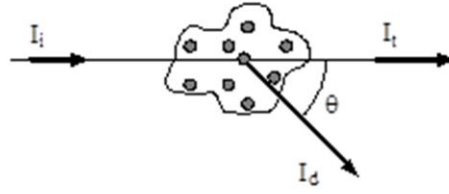


Figura 2.1 Fenómeno de la dispersión. El plano de la dispersión viene dado por la radiación incidente (I_i) y la radiación dispersada (I_d), y ambas relacionadas mediante el ángulo de dispersión θ . La intensidad dispersada por el volumen de dispersión de la muestra varía con el tiempo y es esta fluctuación la que llega al detector.

$$E_i(t) = E_0 \exp i(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega t) \quad (2.3)$$

donde \vec{k}_i es el vector de onda,

$$k_i = \frac{2\pi n_0}{\lambda_i} \quad (2.4)$$

siendo n_0 el índice de refracción del medio y λ_i la longitud de onda de la radiación incidente en el vacío. El producto $\vec{k}_i \cdot \vec{r}$ representa la fase de la onda en la posición \vec{r} .

La teoría electromagnética permite llegar a la siguiente expresión para el campo dispersado a una distancia R_d del volumen de dispersión de la muestra:

$$E_s(t) = \frac{1}{4\pi c^2 R_d} \int_V \frac{\delta^2}{\delta t'^2} E_i(\vec{r}, t') \delta \mathcal{E}(\vec{r}, t') d^3 r \quad (2.5)$$

siendo t' el tiempo de retardo, definido como $t' = t - R_d - r/c$, y $|R_d - r|/c$ es el tiempo que tarda la luz en viajar desde el volumen de dispersión en la posición \vec{r} al detector situado en R_d en el sistema de referencia del laboratorio. $\delta \mathcal{E}(\vec{r}, t')$ Refleja el desplazamiento de la constante dieléctrica de su valor medio en un elemento de volumen situado en la posición \vec{r} y a un tiempo t' . Puesto que $R_d \gg r$ y la constante dieléctrica fluctúa lentamente comparada con el tiempo de tránsito de la luz a través del medio difusor, se

puede suponer que $kr \ll \omega_0 t$, y en estas condiciones la ecuación anterior se transforma en:

$$E_s(t) = \frac{\pi E_0}{\lambda^2 R_d} \exp(-i\omega_0 t) \int_V \delta \varepsilon(\vec{r}, t) \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}) d^3 r \quad (2.6)$$

donde $\vec{q} \cdot \vec{r}$ representa el cambio de fase (diferencia de camino óptico recorrido) en la luz dispersada por un elemento de volumen, situado en la posición \vec{r} , respecto a un elemento de volumen situado en el origen $\vec{r} = 0$. La diferencia entre los vectores de onda incidente y dispersada, $\vec{q} = \vec{k}_d - \vec{k}_i$ se denomina vector de onda de dispersión o vector de transferencia de momento. Puesto que la transferencia de momento es muy pequeña o lo que es lo mismo, las longitudes de las ondas incidente y dispersada son aproximadamente iguales, $\lambda_i \approx \lambda_d$, esto es, $|\vec{k}_i| \approx |\vec{k}_d| = k$, es posible expresar el vector de onda como:

$$|\vec{q}|^2 = |\vec{k}_d - \vec{k}_i|^2 \approx 4k^2 \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{16\pi^2 n_0^2}{\lambda_i^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.7)$$

siendo la magnitud del **vector de onda**:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_i} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.8)$$

Al contrario que en la dispersión de luz estática, en la dispersión dinámica no se promedian los fotones, sino que se correlacionan.

Como ya se ha mencionado anteriormente en el capítulo de Introducción y objetivos, las partículas o macromoléculas en disolución están chocando continuamente con las moléculas de disolvente, por lo que tienen un movimiento constante al azar, llamado *Browniano*. Por *efecto Doppler* este movimiento produce un ensanchamiento simétrico de la frecuencia de la luz difundida respecto a la luz incidente. Este ensanchamiento también se puede interpretar como variaciones en la intensidad de luz difundida provocadas por el movimiento colectivo de las moléculas que causa fluctuaciones temporales de la constante dieléctrica.

En el caso de disoluciones en que las moléculas de soluto son grandes comparadas con las del disolvente las fluctuaciones en la constante dieléctrica son debidas principalmente a variaciones en la concentración. Por tanto, la anchura de la banda Rayleigh está directamente relacionada con

el tiempo de relajación característico de las fluctuaciones de concentración, es decir con las propiedades dinámicas de las macromoléculas o partículas en la disolución y las bandas *Brillouin* no son apreciables en el espectro.

El caso de las macromoléculas y coloides implica ensanchamientos muy pequeños y las técnicas interferométricas no alcanzan la resolución necesaria. Fue en 1955 cuando Forrester, Gudmunsen y Johnson² introdujeron lo que ellos llamaron técnicas de mezcla óptica. Se basan en el hecho de que los tubos fotomultiplicadores detectan el cuadrado del campo eléctrico de la radiación, es decir, la corriente generada por éstos es proporcional a este cuadrado y las componentes oscilantes del campo se mezclan de forma efectiva en el fotocátodo del detector, desplazando de esta forma la frecuencia central a cero.

Cumming³ y col. y Pecora⁴ aplicaron, de manera independiente, esta técnica para estudiar el ensanchamiento de la banda Rayleigh producido por una disolución de partículas. En esta técnica no se determina directamente el espectro sino que se estudian las propias fluctuaciones en la intensidad de luz difundida^{11,12,13}, obteniéndose la función de autocorrelación de intensidades, $G_2(t)$, definida como el promedio temporal del producto de la intensidad en dos tiempos discretos separados por un intervalo t

$$G_2(t) = \langle I_d(t') I_d(t'+t) \rangle = \langle |E_d(t')|^2 |E_d(t'+t)|^2 \rangle \quad (2.9)$$

donde los límites de esta función son: si el intervalo de tiempo es igual a cero, se está promediando el producto de la señal a tiempos idénticos y por tanto determinando el promedio del cuadrado de la señal cuando $t = 0$,

$$G_2(t) = \langle I_d(t) I_d(t) \rangle = \langle I_d^2 \rangle \quad (2.10)$$

En el caso de que el intervalo de tiempo sea muy grande, las señales que se producen en los dos instantes dejan de estar correlacionadas. Los sucesos que son responsables del valor de la señal en esos dos instantes son independientes, por tanto, el promedio del producto es igual al producto de los promedios, y cuando $t \rightarrow \infty$, $G_2(t) = \langle I_d(t') I_d(t) \rangle = \langle I_d(t') \rangle \langle I_d(t) \rangle = \langle I_d \rangle^2$ el correlador obtiene la función de correlación de la intensidad de luz difundida, $G_2(t)$, la **relación de Siegert**^[225], nos proporciona la conexión que existe entre ésta y la función de correlación del campo eléctrico, $G_1(t)$:

$$G_2(t) = \langle I_d \rangle^2 + |G_1(t)|^2 \quad (2.11)$$

Normalizando se obtiene la función de autocorrelación de intensidades normalizada, $g_2(t)$:

$$g_2(t) = \frac{G_2(t)}{\langle I_d \rangle^2} = 1 + \beta |g_1(t)|^2 \quad (2.12)$$

siendo β el denominado *factor de coherencia* porque está relacionado con el número de áreas coherentes que ve el detector y suele ser cercano a la unidad. $g_1(t)$ es la función de autocorrelación de la intensidad dispersada en función de t normalizada^[226, 227]:

$$g_1(t) = \frac{\langle E_d(t')E_d(t'+t) \rangle}{\langle E_d(t) \rangle^2} \quad (2.13)$$

Para terminar con las funciones de correlación, se define el *factor de estructura dinámico*, $S(q, t)$, que es la forma no normalizada de $g_1(t)$. Para N centros difusores correlacionados entre sí, tenemos:

$$S(q, t) = \frac{1}{N^2} \left\langle \sum_{i,j} \exp \{ i\mathbf{q} [\mathbf{r}_i(t'+t) - \mathbf{r}_j(t')] \} \right\rangle \quad (2.14)$$

Este factor de estructura es el que se relaciona con las propiedades físicas de las partículas en disolución ya que es proporcional a la transformada espacial de Fourier^[228] de las fluctuaciones de la densidad^[229].

Los métodos de resolución de la función de autocorrelación son el método de cumulantes y los métodos de regularización como CONTIN o REPES. Ambos tipos de aproximación permiten obtener el coeficiente de difusión, D , a partir de la función de correlación.

Método de cumulantes

El método de cumulantes es válido para distribuciones lo suficientemente estrechas, obteniendo los mismos resultados por cualquier método de análisis si la muestra es monodispersa. El análisis de la función de correlación se realiza ajustando a un polinomio de tercer orden.

$$\ln g_1(t) = \ln A - \Gamma t + \frac{\mu_2}{2} t^2 - \frac{\mu_3}{6} t^3 \quad (2.15)$$

donde los parámetros de ajuste se denominan cumulantes, A es la amplitud, Γ el promedio de la velocidad de decaimiento, μ_2 es el segundo cumulante y μ_3 el cumulante de tercer orden. La desviación estándar y el coeficiente de regresión se calculan con las siguientes fórmulas:

$$Std.Dev = \left(\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N r_{ij}^2 \right)^{1/2} \quad (2.16)$$

donde r_{ij} se denomina residuo y es igual a:

$$r_{i,j} = \ln \left(g^2(t_i) - 1 \right) - \sum_{n=0}^j a_n t_i^n \quad (2.17)$$

$$r_j^2 = 1 - \frac{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} r_{i,j} r_{i+1,j}}{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N r_{i,j}^2} \quad (2.18)$$

donde i es el índice de los distintos canales de correlación, N es el número de canales usados en el ajuste y j es el orden del polinomio de ajuste.

El radio hidrodinámico, la anchura de la distribución del radio y el índice de polidispersidad (PDI) se calculan a partir del ajuste al polinomio de tercer orden, de acuerdo a las siguientes ecuaciones^[230, 231]:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta\Gamma} q^2 \quad (2.19)$$

$$Anchura = \frac{\sqrt{\mu_2}}{\Gamma} R_H = w \quad (2.20)$$

$$PDI = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \quad (2.21)$$

Método CONTIN^[232]

Desarrollado por Provencher^[233], este método de análisis utiliza la transformada de Laplace inversa de la función de correlación y se cumple para sistemas polidispersos y muestras multimodales que no se puedan ajustar por cumulantes.

$$g_1(t) = \int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} e^{-\Gamma t} G(\Gamma) d\Gamma \quad (2.22)$$

donde G es la función de distribución de la velocidad de decaimiento. La función de correlación se calcula a partir de la relación de Siegert^[225], $g_1(t)$ en función de t , el tiempo. Con el método de ajuste no lineal se puede calcular $g_2(t)$:

$$g_2(t) - 1 = \left(\int_{\Gamma_{\min}}^{\Gamma_{\max}} e^{-\Gamma t} G(\Gamma) d\Gamma \right)^2 \quad (2.23)$$

$$\Gamma^{-1} = \tau^{-1} = Dq^2 \quad (2.24)$$

$$g_1(t) = e^{-\Gamma t} = e^{-Dq^2 t} \quad (2.25)$$

que relaciona directamente $g_1(t)$ con D . Esta dependencia lineal de $\ln g_1(t)$ con q^2 es característico del comportamiento difusivo de la muestra.

Mediante este método el análisis de las funciones simula funciones de autocorrelación a varios ángulos, mediante este método y el análisis global de todas ellas se realiza para obtener el coeficiente de difusión de la muestra.

En la ecuación (2.24) se ha sustituido Γ para observar la relación de la función de correlación con el coeficiente de difusión. Así, se observa que el tiempo del decaimiento es inversamente proporcional a q^2 . Si se representa Γ^{-1} vs q^2 ^[234], la ordenada en el origen será D que es el coeficiente de difusión. El promedio del coeficiente de difusión D puede ser obtenido a un solo ángulo o a un rango de ángulos en función del vector de onda q .

Una vez determinado el coeficiente de difusión, es posible conocer el tamaño de las partículas en la disolución. La variación de la función de correlación con el tiempo está relacionada con el tamaño de las partículas ya que para partículas grandes, la velocidad de decaimiento es mayor que para partículas pequeñas. La velocidad de las partículas que se desplazan siguiendo un movimiento browniano está relacionada con su tamaño mediante la ecuación de Stokes-Einstein, que solo puede ser aplicada si se considera que se está a dilución infinita (no hay interacción entre las partículas) y para partículas esféricas

$$D = \frac{k_B T}{6\pi R_h \eta} \quad (2.26)$$

donde D es el coeficiente de difusión, R_h el radio hidrodinámico aparente, η la viscosidad del disolvente y T la temperatura absoluta. Si se cumplen las condiciones consideradas, es posible conocer el tamaño de la partícula ya que el resto de parámetros son conocidos.

Instrumentación para DLS

Las medidas se han realizado en un *ALV-LSE- 5003* (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Alemania) montado sobre una mesa anti vibratoria y equipado con un goniómetro ALV CG5-8F.

La célula de medida es de cuarzo con 1 cm de diámetro y un volumen de 3 ml. Para mantener termostaticada la muestra se dispone de un baño termostático de agua conectado al equipo. El equipo, mostrado en la Figura 2.2 utiliza como fuente de luz un láser de Ar^+ que trabaja a 514.5 nm y en general se ha trabajado a una potencia de 200 mW. El haz incidente se divide en dos (divisor de haz 1:1), una parte se utiliza para monitorizar el alineamiento y las fluctuaciones de intensidad del láser con un fotodiodo de cuatro cuadrantes. La medida de la intensidad de luz dispersada se realiza mediante dos detectores, dos fotomultiplicadores ALV/SO en modo de pseudocorrelación cruzada.

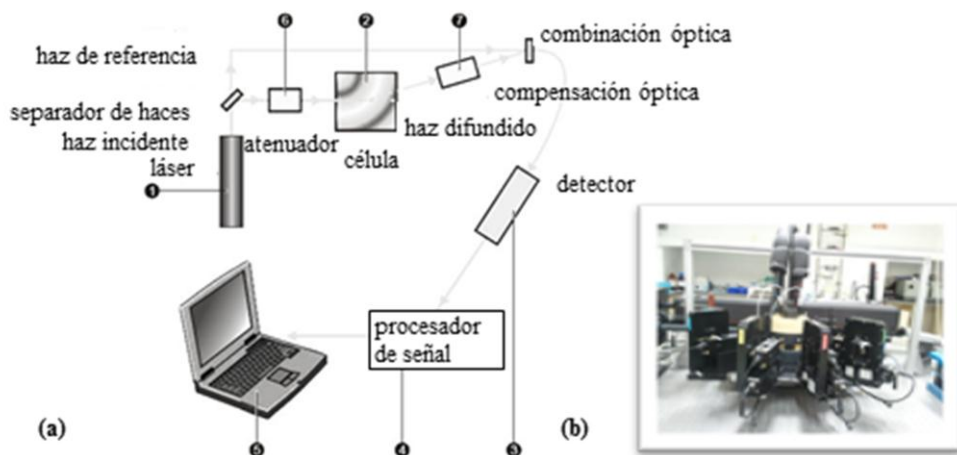


Figura 2.2 (a) Esquema del equipo de dispersión ALV-5003. (b) Foto del mismo.

La mayor parte del haz molecular pasa en línea recta a través de la muestra, pero una parte es dispersada por las partículas en el interior de la muestra. Se utiliza un detector (3) para medir la intensidad de la luz dispersada, que en este caso es un fotomultiplicador ALV/SO-SIPD. La intensidad de la luz dispersada dentro de la célula debe estar dentro de un rango específico para que el detector pueda medirla correctamente. De ese modo si la luz detectada es demasiado grande, se sobrecargará el detector, por lo que es necesario utilizar un atenuador (4) que reduzca la intensidad del láser. La intensidad de la dispersión de la señal para el detector pasa por un procesador digital de señal llamado correlador (5). El correlador calcula, a partir de la intensidad dispersada en intervalos de tiempos Δt , la función de autocorrelación de intensidades. Se utiliza un correlador digital múltiple ALV-5000. La información del correlador se envía a un ordenador (6), donde el software permite analizar los datos utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente para obtener D y R_H .

Metodología

Se preparan las disoluciones acuosas muy diluidas de liposomas que se transfirieron a una célula de dispersión termostatzada hasta alcanzar la temperatura de 25°C. Para cada muestra se obtienen por duplicado las funciones de autocorrelación a distintos ángulos de dispersión comprendidos entre 30° y 150°. El conjunto de funciones de autocorrelación condujeron a distribuciones de tasas de decaimiento similares con ambos métodos de análisis. De cada función se calcularon los tiempos de decaimiento, cuya inversa se representó frente al cuadrado del vector de onda. De la pendiente de dicha representación se obtuvo el coeficiente de difusión. Mediante la ecuación de Stokes-Einstein se calculó el radio hidrodinámico.

Para el estudio de la variación de temperatura realizado para los microgeles, se fijó un ángulo de medida, 90°, y la temperatura se incrementó de 293 a 313K en pasos de 2K para luego bajar de nuevo hasta 293K, con el fin de obtener un ciclo completo y comprobar la reversibilidad. Por cumulantes se extrajo el valor del radio hidrodinámico para cada temperatura.

2.1.2 Dispersión de rayos X de bajo ángulo (SAXS)

SAXS y SANS son técnicas complementarias a la dispersión de luz estática (LS), que permiten extender a mayores valores de q las medidas de dispersión. En dispersión de luz, el contraste se debe a variaciones en el índice de refracción entre el objeto (partícula, macromolécula, etc) y el disolvente. En SAXS el contraste se debe a la densidad electrónica y por tanto los átomos más pesados, con mayor densidad electrónica, dan lugar a mayor contraste. Por el contrario, en SANS el contraste se debe a los núcleos, y la longitud de dispersión, que fija el contraste, es similar para casi todos los núcleos habitualmente utilizados excepto el H, que tiene una longitud de dispersión negativa y el contraste generalmente se obtiene con mezclas de material hidrogenado y deuterado.

Fundamentos de SAXS

La dispersión de rayos X a bajo ángulo es una técnica analítica empleada en la caracterización estructural de materiales de tamaño nanométrico. La muestra es irradiada con un haz de rayos X monocromático y se genera un ensanchamiento del haz. Las heterogeneidades en un medio continuo son las que dan lugar a la dispersión de rayos X a ángulos pequeños, sean partículas, precipitados en las aleaciones, polímeros, etc. De la distribución de intensidades a bajo ángulo se obtiene información sobre tamaño de las partículas, morfología y estructura interna^[208].

La función de dispersión de los electrones puede ser calculada si conocemos la forma del dispersante a partir de la transformada de Fourier de la función:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \rho(r) \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (2.27)$$

$$\rho(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} r q I(q) \sin(rq) dq \quad (2.28)$$

La ecuación (2.27) muestra la densidad electrónica, $\rho(r)$, que se considera uniforme para partículas pequeñas. En el caso de una dispersión de partículas, tanto el dispersante como el disolvente muestran densidades electrónicas, por lo que la curva de dispersión es fruto de la diferencia entre

ambas densidades. A esta diferencia de densidad electrónica es a lo que se denomina contraste.

La curva de dispersión ayuda a deducir el tamaño, forma y densidad electrónica de un sistema, como ya se ha comentado, pero para ello se ha de elegir el modelo adecuado que describa a los datos experimentales. Convencionalmente, la intensidad dispersada se suele analizar utilizando dos aproximaciones. Por un lado, se ha propuesto una ecuación exponencial y, por otro, una fórmula polinomial. La primera se conoce como la Ley de Guinier y la segunda como la Ley de Porod. La Ley de Guinier coincide bien con los datos experimentales en los ángulos muy pequeños, por lo que será muy útil si las heterogeneidades dispersoras son relativamente grandes, mientras que la Ley de Porod es la más adecuada para ajustar los ángulos mayores donde la intensidad decrece con una relación de $1/4$ con respecto a q ^[235]. De estos dos modelos se hablará con más detalle en el apartado de metodología.

En esta técnica se trabaja normalmente en transmisión y con un haz de rayos X muy fino para que pueda ser interceptado sin bloquear la luz dispersada, y además facilitar la medida a bajos ángulos. Para disminuir el ruido de fondo se recomienda que la distancia del detector a la muestra sea grande para que se separe el haz dispersado del incidente y que exista vacío desde la fuente de los rayos X hasta el detector. El rango de tamaño que puede medirse con esta técnica está comprendido ente 0.5 y 50 nm en materiales como películas de polímeros, microemulsiones, proteínas, liposomas, etc.

Instrumentación

El equipo de rayos X de bajo ángulo (SAXS) utilizado se muestra en la Figura 2.3:

La longitud de onda utilizada en este equipo es 1.54 Å, el diámetro del detector es de 200 mm y el diámetro de bloqueador del haz es 4 mm. El rango accesible de vectores de onda, q , es de 0.011-0.5 Å⁻¹, y por tanto el tamaño de partícula observable será de al menos 60 nm.

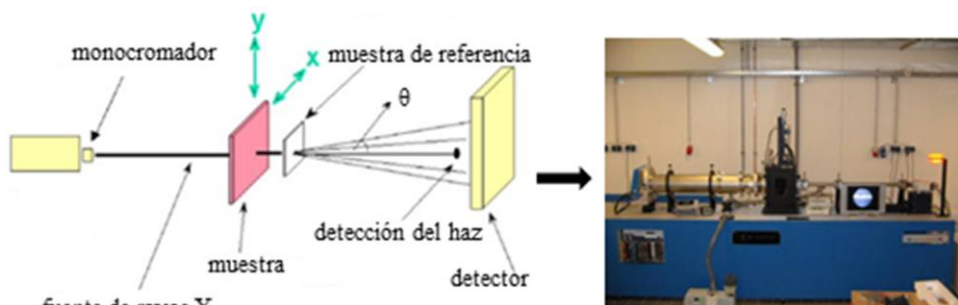


Figura 2.3 Equipo de dispersión de rayos X (SAXS) localizado en la universidad de Aachen (Alemania), RWTH.

Metodología

Para la utilización del equipo de dispersión de rayos X, se deben introducir tres capilares, uno vacío, otro en el que se encuentra el disolvente y otro con la muestra cuyas características se quiere conocer. El tiempo de medida depende mucho de la muestra a analizar y del contraste de densidad electrónica, y puede ser desde unos minutos hasta horas.

Las disoluciones de liposomas presentan en general un alto contraste con rayos X, por lo que es posible observar con facilidad las diferencias en su estructura química. Si se consideran liposomas unilamelares, en la Figura 2.4 se observan los parámetros estructurales que se obtienen con la técnica SAXS.

En la Figura 2.4, se muestra un liposoma unilamelar esférico formado por anillos concéntricos, de radios R_i y R_o , un espesor formado por las cabezas polares de los lípidos igual a t_h y un espesor de las colas de los lípidos igual a t_c . Como consecuencia, la intensidad dispersada en el rango de q se describe, según el modelo de Cantú^[236] mediante

$$I(q) = \frac{4\pi}{q^4} \left[(\rho_{c,e} - \rho_{h,e}) \text{sen} \left(q \frac{t_c}{2} \right) + (\rho_{h,e} - \rho_{s,e}) \text{sen} \left(q \frac{2t_h + t_c}{2} \right) \right]^2 \quad (2.29)$$

donde t_c es el espesor de la capa hidrofóbica y t_h es el espesor de la capa de las cabezas polares. La densidad de las bicapas formadas por mezclas de

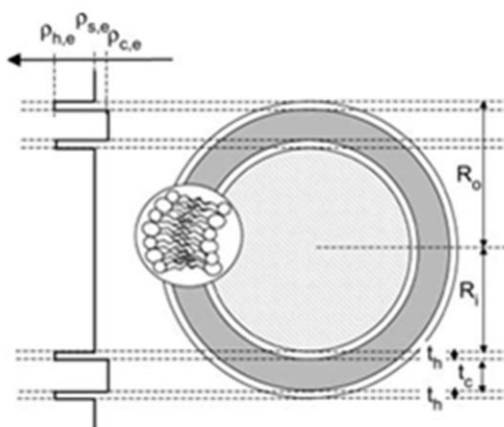


Figura 2.4 Perfil de densidades obtenido según la técnica SAXS.

lípidos ha sido ya calculada por otros investigadores, tomando finalmente el valor de 0.92 kg/dm^3 para la mezcla de lípidos.

En general, las curvas de SAXS expresan la variación de la intensidad de dispersión en función del vector de onda. La intensidad dispersada de una partícula es máxima cuando $q=0$ y disminuye en una proporción que depende del tamaño y de la conformación de la partícula^[237].

La curva de $I(q)$ en función de q en la que se distinguen 4 zonas se muestra en la Figura 2.5.

Las regiones 1, 2, 3 comprenden los dominios encontrados en las curvas de SAXS y pueden dar información sobre el radio de giro (R_g) que se define como el parámetro que da información sobre la distribución de la masa de la partícula alrededor del centro de gravedad, siendo un parámetro importante especialmente cuando en la partícula se pueden adoptar varias conformaciones. La región 1 denominada de Guinier situada a valores bajos de q permite la determinación directa de R_g ^[238].

Regla de Guinier: Asumiendo el caso ideal de partículas esféricas en disolución, Guinier mostró que para $q=0$, la curva de intensidades puede ser descrita como una función exponencial. Asimismo, a valores muy bajos de q , la intensidad dispersada depende directamente del radio de giro mediante una aproximación conocida como Ley de Guinier, válida cuando se cumple: 1) $q^2 R_g^2 \ll 1$ para una esfera y 2) regla del pulgar, $q^2 R_g^2 \ll 1.2$, para una estructura globular.

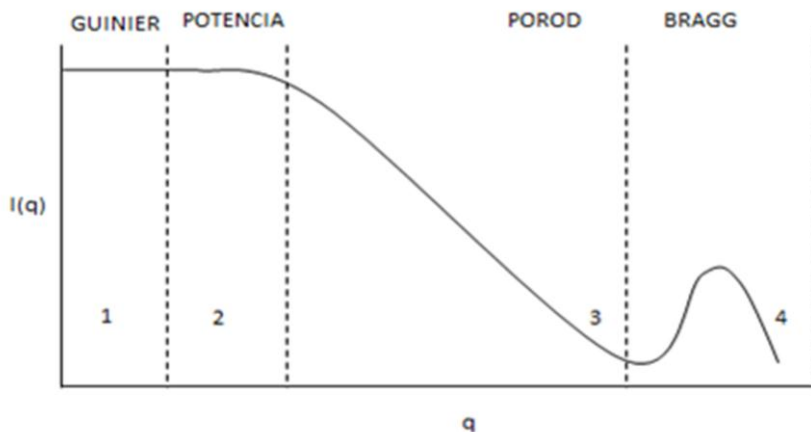


Figura 2.5 Curva de la intensidad dispersada en función de q en la que se distinguen las regiones marcadas y de las cuales se van a estudiar las de mayor interés para nuestros sistemas: Guinier y Porod.

$$I(q) \cong I_0 \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (2.30)$$

donde I_0 es la intensidad a ángulo cero y R_g es el radio de giro. El gráfico de Guinier $\ln I(q)$ vs q^2 es una recta:

$$\ln I(q) = \ln I_0 - \frac{R_g^2}{3} q^2 \quad (2.31)$$

La pendiente de la recta es igual a $\alpha = -R_g^2/3$ permitiendo determinar el radio de giro de Guinier $R_g = \sqrt{-3\alpha}$ y la ordenada en el origen I_0 .

Si se ajusta a una recta en el intervalo seleccionado, el sistema de partículas se considera monodisperso, en caso contrario es un sistema de partículas polidisperso.

Además de la curva de Guinier existen otros métodos para analizar la curva de dispersión, como la obtención de la función de distribución de distancias de la partícula $\rho(r)$ [239]. Otros métodos son aquellos que utilizan el programa GNOM [240] que calcula el radio de giro, el cual puede ser comparado con el obtenido por el método de Guinier [235].

Función de distribución de pares: Una función $\rho(r)$ o función de distribución de distancias pares es utilizada para describir los conjuntos de las distancias entre todos los átomos dentro de la partícula dispersada y es una herramienta apropiada para detectar cambios conformacionales siendo posible observar la forma adquirida de la partícula dispersada en diferentes condiciones:

$$\rho(r) = 4\pi r^2 \gamma_0(r) \quad (2.32)$$

donde $\rho(r)$ es la función de correlación, también llamada función característica que depende tan solo de la geometría de la partícula, $\gamma_0(0) = 1$ y $\gamma_0(r \geq D_{max}) = 0$ donde D_{max} es la máxima distancia intra-partícula.

La función de correlación, $\rho(r)$, puede ser obtenida a partir de la transformada indirecta de Fourier de $I(q)$ y obtener información sobre la forma de la partícula. Las partículas globulares poseen una $\rho(r)$ con forma gaussiana centrosimétrica con un máximo en $D_{max}/2$. Las partículas alargadas poseen una $\rho(r)$ con el máximo a menores distancias. Las partículas achatadas muestran el máximo deslocalizados para valores menores de $D_{max}/2$ ^[239, 241]. El radio de giro se puede calcular a partir de esta ecuación:

$$R_g^2 = \frac{\int r^2 \rho(r) dr}{2 \int \rho(r) dr} \quad (2.33)$$

Y la intensidad I_0 se puede calcular con:

$$I_0 = 4\pi \int_0^{D_{max}} \rho(r) dr \quad (2.34)$$

La curva de dispersión es utilizada para evaluar estos dos parámetros, el límite angular de nuevo serán bajos ángulos pero los valores obtenidos son más fiables y menos sensibles a los efectos de interacciones, si se compara a los obtenidos con la aproximación de guinier.

El programa de cálculo GNOM desarrolla una función de cálculo $\rho(r)$ a partir de un modelo inicial, en este caso de una esfera formada por un gran número de elementos esféricos. Basado en este modelo, un programa calcula la función de dispersión y si se ajusta, el modelo es el correcto^[242, 243].

Análisis de Kratky: La curva de kratky es utilizada para analizar la conformación de los liposomas, aunque también es utilizada para analizar

polímeros y proteínas. El grado de plegamiento de una partícula dispersada puede ser cualitativamente determinada utilizando una curva de Kratky, si se representa $I(q)q^2$ versus q ^[244], según la ecuación:

$$\lim_{q \rightarrow \infty} (q^2 I(q)) = \frac{2(1 - (qR_g)^{-2})}{R_g^2} \quad (2.35)$$

En la Figura 2.6 se muestra un ejemplo del análisis que se realiza según *Kratky*. El grado de plegamiento de la partícula será desorganizado, parcialmente organizado y organizado según sea la tendencia de la curva representada.

La forma producida por las heterogeneidades responsables de la dispersión de rayos X a ángulos pequeños se estimó a partir del gráfico de Kratky, i.e. $q^2 \cdot I(q)$ frente a q . De ésta curva se evaluó si estas heterogeneidades presentan una forma fibrilar, esférica o laminar. Si la curva obtenida es una parábola, las heterogeneidades muy probablemente sean de conformación esférica, mientras que, si se obtiene una recta, la forma es fibrilar. Por último, si es media parábola, se trata de láminas^[245].

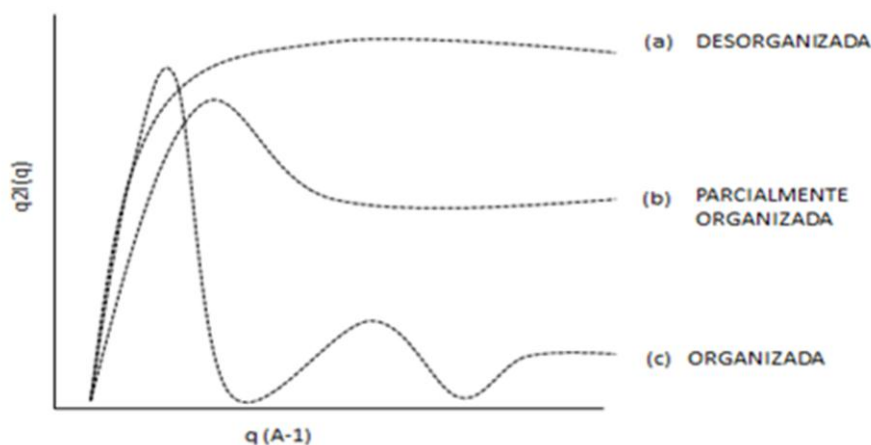


Figura 2.6 Clasificación según Kratky cuando se representa el producto del cuadrado del vector de onda por la intensidad dispersada con respecto al vector de onda.

2.1.3 Dispersión de neutrones de bajo ángulo (SANS)

Fundamentos

Es una herramienta bien establecida para la caracterización de nanoestructuras^{[246, 247],[248],[249]}. El rango de trabajo es desde una escala atómica (1 nm) hasta 600 nm. Desde su descubrimiento, hace más de 40 años^[250-252] esta técnica ha experimentado un aumento de su uso en investigación. El objetivo de una medida con dispersión de neutrones de bajo ángulo es determinar la forma y la organización de las heterogeneidades encontradas en un medio continuo. El uso de macromoléculas deuteradas y un entorno no deuterado permite un contraste que a través de un análisis exhaustivo da información de los sistemas estudiados.

La curva de la dispersión de la intensidad se calcula a través de la transformada de Fourier obtenida para una muestra, y que depende directamente del vector de onda definido en la ecuación (2.36). Para calcular las características estructurales de la muestra se debe eliminar el ruido de fondo debido al disolvente, y a la célula en la que se realiza la medida. Para ello, se mide el disolvente solo, una célula vacía y la señal sin célula. Los valores de intensidad obtenidos se consideran en todas las medidas de la muestra que se mide en cada momento según la expresión:

$$I(q) = \left[\frac{I_{sol}(q)}{M_{sol}T_{sol}} - \frac{I_{cel}(q)}{M_{cel}T_{cel}} \right] - \left[\frac{I_{solv}(q)}{M_{solv}T_{solv}} - \frac{I_{cel}(q)}{M_{cel}T_{cel}} \right] \quad (2.37)$$

donde I_{sol} , I_{cel} , I_{solv} son valores medios obtenidos para la función de intensidad en la muestra, célula vacía y disolvente, respectivamente. M es la intensidad del haz incidente y T la intensidad del haz transmitida por la solución.

Una vez realizados los ajustes necesarios, los datos que se obtienen directamente con el equipo de dispersión, se utilizaron dos tipos de análisis. Uno de ellos se realizó aplicando un algoritmo que se basa en el modelo de esfera hueca y el otro se realizó a partir de modelos propuestos por autores como Guinier que se describe a continuación.

Partiendo de la ecuación (2.38), utilizando la aproximación de Guinier para ángulos pequeños, al representar $\ln I(q)$ frente a q^2 se pueden obtener

los valores de la intensidad dispersada a ángulo cero I_0 y el correspondiente radio de giro o radio de Guinier (R_g), a partir de la pendiente en la ecuación (2.39). I_0 es bien conocido para disoluciones de muestras monodispersas.

$$I_0 \alpha [(\rho - \rho_s)V]^2 = (\rho V)^2 \quad (2.40)$$

Para las vesículas, al trabajar con contraste (H_2O y D_2O), la diferencia de densidades de longitud dispersada será del siguiente modo:

$$(\rho - \rho_s)V = (\rho_{bicapa} V_{bicapa} + \rho_{core} V_{core}) - \rho_s (V_{bicapa} + V_{core}) \quad (2.41)$$

La densidad que existe en el centro coincide con la del disolvente exterior, por lo que no se considera en la ecuación (2.41). La ecuación (2.41) es válida para $qR_g \ll 1$ y para una esfera el radio de giro está relacionado con el radio exterior, R , con la ecuación de Lefmann^[253]:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^R \gamma(r) \cdot r^4 dr}{\int_0^R \gamma(r) \cdot r^2 dr} \quad (2.42)$$

donde $\gamma(r)$ es una función que expresa el interior de la partícula. Para esferas $\gamma(r)=1$ cuando $0 \leq r \leq R$ y para cero la ecuación se reduce a

$$(R_g)^2 = \frac{3}{5} R^2 \quad (2.43)$$

El radio de giro de la partícula se puede relacionar de forma directa con el radio de partícula a partir de la ecuación (2.43). En el caso de los liposomas $\gamma(r)=1$ cuando $R-e \leq r \leq R$ donde e es el espesor de la bicapa lipídica, y para cero, la ecuación se convierte en

$$R_g^2 = \frac{3}{5} \frac{R^5 - (R-e)^5}{R^3 - (R-e)^3} \quad (2.44)$$

El radio de giro obtenido de la aproximación de Kratky-Porod depende de la fracción molar de agua en la disolución. La aproximación de Kratky y Porod se ajusta bien en el intervalo de $0.1 \leq q^2 \leq 0.6 \text{ nm}^2$ para liposomas unilamelares pequeños. Al realizar un ajuste no lineal de los valores experimentales para la intensidad dispersada, se obtiene el radio de giro y el valor de $I(q) \cdot q^2$ en

el límite de $q^2 \rightarrow 0$. El aumento de la dispersión de los puntos experimentales y de los errores experimentales cuando se varía la fracción molar de agua en la disolución se debe a la disminución de contraste de la densidad dispersada entre la bicapa lipídica y la fase acuosa. Así el valor del radio de giro y el valor del límite de $I(q) \cdot q^2$ sirven para obtener parámetros de la estructura de la bicapa lipídica. Nosotros usaremos un método desarrollado en los 90 por Sadler y col.

Del método de Sadler se van a utilizar los datos adimensionales que se utilizan para el cálculo de espesor de la bicapa lipídica y que se relaciona con el radio de giro mediante la siguiente ecuación:

$$R_g^2 = R_{g,\infty}^2 + \frac{\alpha}{\rho_{media}}(x_H) \quad (2.45)$$

Donde $R_{g,\infty}^2$ es el radio de giro en el contraste infinito, $\rho_{media}(x_H) = \rho_{liposoma} - \rho_{agua}(x_H)$ es el valor del contraste en x_H , y α es un parámetro adimensional tabulado. Este parámetro describe la variación de la densidad de longitud de dispersión de la bicapa alrededor de $\rho_{liposoma}$ y está influenciado por las diferencias entre la dispersión que se produce en la región polar de la bicapa y la región hidrofóbica.

$$R_{g,\infty}^2 = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} z^2 \delta(z) dz}{\int_{-\infty}^{\infty} \delta(z) dz} \quad (2.46)$$

donde $\delta(z)$ es el parámetro adimensional con valores entre 0 y 1 en la dirección z perpendicular a la bicapa. Para este caso, en el que existe una distribución homogénea de agua dentro de la bicapa, la ecuación se resuelve con $\delta(z) = 1$ y el espesor de la bicapa lipídica se obtiene

$$R_{g,\infty} = 12^{-0.5} \cdot d_{g,\infty} \quad (2.47)$$

Con esta ecuación se puede calcular el espesor de la bicapa y comparar el valor con los datos bibliográficos obtenidos para otras disoluciones de liposomas. Experimentalmente se ha encontrado que este valor así calculado es mayor que el valor real debido a que la distribución de agua dentro de la

bicapa no se distribuye de forma homogénea y por lo tanto el cálculo de la densidad de longitud dispersada es una aproximación del valor real.

Instrumentación

Los experimentos de SANS en el reactor nuclear ORPHEE se realizaron con un instrumento PAXY del Laboratoire Leon Brillouin en Saclay, Francia y utilizan una fuente de neutrones con 93% de uranio enriquecido ^{235}U . El flujo del haz directo fue medido usando un atenuador y la señal del agua fue corregida a valores altos de q . Los datos obtenidos se redujeron a una escala absoluta (Ver Figura 2.7).

Los experimentos en el ISIS, Inglaterra se realizaron en un equipo denominado LOQ. Este instrumento está formado por 11 m de línea de vacío a través de la cual fluyen los neutrones y se dirigen a la muestra. Tras ser dispersados por la muestra, son recogidos por un detector en el que se puede detectar la posición de los neutrones y el tiempo que tardan en llegar. Esta información es tratada con el software para obtener las características estructurales de los liposomas en disolución, $P(q)$ y $S(q)$.

Metodología^[254, 255]

Las vesículas en disoluciones diluidas no interaccionan, por lo que el valor del factor de estructura $S(q)$ se considera 1 en todo el rango de q estudiado. El factor de forma de hasta tres capas concéntricas con radio R_i se calcula según la fórmula de Pedersen (1997)^[252].

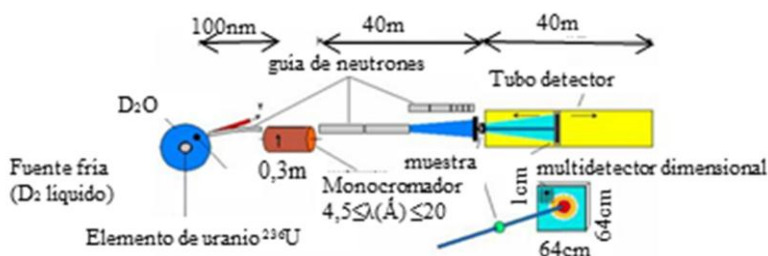


Figura 2.7 Esquema de un equipo de SANS en el reactor de Saclay. El vector de onda es de 1.2 nm y la distancia de la muestra al detector de 5 m para la obtención de valores de vectores de onda bajos. El detector es un multidetector de He en 2D y el colimador situado antes de la muestra es controlado al cambiar la posición muestra-detector.

$$P(q) = \left[\sum_{i=1}^4 V_i (\rho_i - \rho_{i-1}) F(q, R_i) \right]^2 \quad (2.48)$$

con

$$F(qr_i) = 3 \left[\frac{\sin(qr_i) - qr_i \cos(qr_i)}{(qr_i)^3} \right] \quad (2.49)$$

donde $F(qr_i)$ es el factor de forma estándar para una esfera homogénea. Los métodos de análisis ya se han comentado en el apartado anterior.

2.1.4 Citometría de flujo

Fundamentos

El citómetro de flujo se utiliza para caracterizar células y orgánulos celulares (partículas biológicas) que fluyen en una suspensión celular. El primer contador celular automático fue desarrollado por Moldavan^[246] (1934) pero no fue hasta 1953 cuando se consiguió un gran avance: Crosland y Taylor^[247] desarrollaron una cámara de flujo basada en la inyección de la muestra en el seno de un fluido a través de un capilar que se estrecha. Durante los años 60 y 70 se producen avances en la tecnología y en sus aplicaciones^[248, 249] y ya a principios de los 80 aparecieron las primeras aplicaciones en biología como un importante avance en el proceso de contar^[20] y medir el tamaño de partículas en poblaciones no homogéneas^[256] y con fluoróforos cuya longitud de onda de excitación era 488 nm.

Instrumentación

Para la lectura por citometría de flujo, las partículas son combinadas con fluoróforo^[257] o sonda fluorescente. Se inyectan las partículas con flujo laminar y pasan una a una por un punto de medida iluminado con luz de alta intensidad. En la Figura 2.8 se observan los componentes principales del citómetro y su funcionamiento. Las partículas con fluoróforo entran en la cámara de flujo y al pasar por delante de un haz láser emiten una luz fluorescente y dispersada que es separada de acuerdo a su longitud de onda.

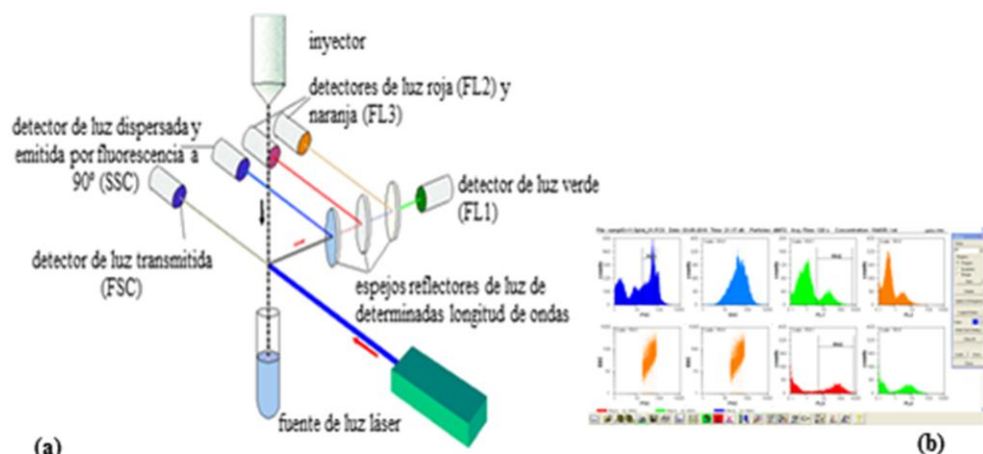


Figura 2.8 (a) Componentes principales de un citómetro de flujo formado principalmente por una serie de detectores, espejos reflectores y la fuente de luz láser. Los sistemas de inyección de muestra deben ser isovolumétricos que permita una velocidad constante. (b) Datos obtenidos del análisis de una muestra^[20].

Así, cuando la luz es dispersada, se registra en un fotodetector, situado detrás de la muestra, enfrente de la fuente emisora que casi coincide con la dirección de la luz incidente y da una medida proporcional al tamaño de la partícula que produce la dispersión en transmisión (FS). Existe otro detector formando un ángulo de 90° con el haz láser (SS) que da información de la luz dispersada y la fluorescencia a 90° . La luz dispersada que llega a los detectores es descompuesta mediante los filtros apropiados manteniendo constante la longitud de onda de trabajo que en cada experimento dependerá del fluoróforo que se utiliza. Los parámetros de fluorescencia que se pueden obtener son FL1, FL2 y FL3 y los fluoróforos utilizados han sido NBD para los liposomas, AF-488 y AF-633 para las cápsulas y capas de polielectrolitos respectivamente.

Metodología

Se ha utilizado un citómetro de flujo Partec Flowmax y para el análisis de los resultados, el ordenador posee el programa propio del equipo que permite analizar los resultados obtenidos. El programa permite determinar la concentración de partículas en la muestra con la que se trabaja. Mediante

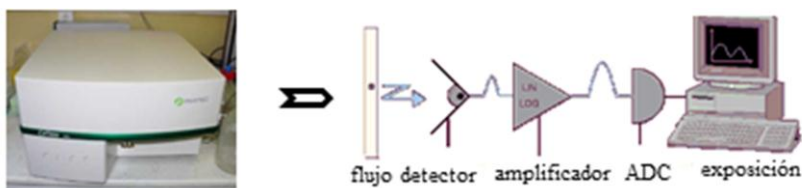


Figura 2.9 Fotografía del citómetro de flujo utilizado y esquema de los componentes principales. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.^[10]

histogramas biparamétricos la información almacenada pasa a llamarse dato bivalente^[258] debido a los dos parámetros de dispersión obtenidos, FSC y SSC. En la Figura 2.9 se observa el citómetro utilizado.

2.2 POTENCIAL ZETA

2.2.1 Fundamentos

El concepto de potencial zeta se conoce desde hace más de cien años, pero las medidas obtenidas eran poco precisas y con mucho error^[235]. En 1985 la Fundación de Electroacústica Moderna (ESA)^[236] patentó esta técnica y el desarrollo, extendiéndola a muestras no diluidas y en todo tipo de disolventes. En la actualidad^[259], esta técnica está bien establecida y cada vez son mayores los investigadores que utilizan la medida del potencial zeta como una herramienta imprescindible^[250]. El potencial zeta es un buen indicativo de las interacciones electrostáticas entre las partículas y se usa normalmente para predecir la estabilidad de una dispersión. Se obtiene a partir de la movilidad electroforética, μ_e , concepto que se resume a continuación.

El efecto electrocinético más estudiado y de especial relevancia en suspensiones coloidales se llama electroforesis o microelectroforesis. La electroforesis^[19] es el movimiento que sufren las partículas cargadas en un

líquido tras aplicarse un campo eléctrico externo y paralelo a la interfase partícula-disolución. La velocidad que adquieren las partículas, v_e , se relaciona con el campo eléctrico aplicado, E_e , a través de la movilidad electroforética, μ_e , según la expresión:

$$v_e = \mu_e E_e \quad (2.50)$$

En la frontera entre la fase móvil y la fase inmóvil, conocida como *plano de deslizamiento*, se genera un potencial denominado *potencial electrocinético* o *potencial zeta*, ζ ^[19, 260-262], que no tiene por qué coincidir con el potencial superficial, Ψ_0 , aunque como este último no se puede medir directamente, se suele suponer que son iguales^[19, 262, 263]. ζ está relacionado con la movilidad electroforética y se puede calcular de distintas formas, en función del tamaño de la partícula. Las tres formas más utilizadas para relacionar potencial zeta y movilidad electroforética son tres: Aproximación de Smoluchowski, aproximación de Hückel y ecuación de Henry.

1. *Aproximación de Smoluchowski o de la doble capa fina*^[264]: es la primera aproximación que se desarrolló para calcular el potencial zeta a partir de medidas experimentales de movilidad electroforética. Considera que las partículas coloidales son esféricas y que su radio, a , es mucho más grande que el espesor de la doble capa eléctrica, k_D^{-1} , tal como se representa en la Figura 2.10 (a). Bajo estas condiciones, el campo eléctrico aplicado afecta al movimiento de la partícula, ya que ésta experimenta un campo distorsionado, y se cumple la expresión:

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon_r \epsilon_0} \mu_e \quad (2.51)$$

donde η es la viscosidad del disolvente y ϵ_0 y ϵ_r son las permitividad del vacío y del disolvente, respectivamente.

2. *Aproximación de Hückel o de la doble capa gruesa*^[265]: considera que las partículas coloidales son esféricas y que su radio, a , es mucho más pequeño que el espesor de la doble capa eléctrica, k_D^{-1} , tal como se muestra en la Figura 2.10 (b). Bajo estas condiciones el campo eléctrico aplicado no provoca ningún movimiento del líquido situado alrededor de la partícula, es decir, la partícula experimenta el campo casi sin distorsionar, y se cumple:

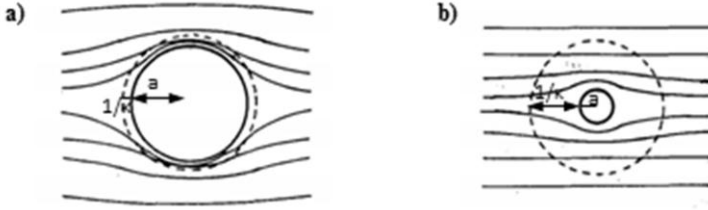


Figura 2.10 Distorsión del campo eléctrico aplicado sobre una partícula coloidal. a) para dobles capas finas, $\kappa_D a \gg 1$ o $a \gg 1$, existe una mayor proporción de iones de electrolito que experimentan un campo distorsionado. b) para dobles capas gruesas, $\kappa_D a \ll 1$ o $a \ll 1$, existe una mayor proporción de iones de polielectrolito que experimentan el campo original sin distorsionar^[19].

$$\zeta = \frac{3}{2} \frac{\eta}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \mu_e \quad (2.52)$$

3. Ecuación de Henry^[266]: Henry fue el primero en resolver el problema para esferas de cualquier radio, a , es decir, para cualquier valor de $k_D a$, llegando a la siguiente ecuación:

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\varepsilon_r \varepsilon_0 f(k_D a)} \mu_e \quad (2.53)$$

siendo $f(k_D a)$ es la función de Henry, que incluye las deformaciones en la polarización de la doble capa eléctrica de la partícula debidas al campo eléctrico aplicado, y viene dado por la expresión:

$$f(k_D a) = 1 - e^{-k_D a} \{5E_7(k_D a) + 2E_5(k_D a)\} \quad (2.54)$$

donde $E_i(k_D a)$ es una integral exponencial de orden i . Este factor se puede calcular para partículas esféricas usando las siguientes aproximaciones:

- Para valores de $k_D a$ bajos ($k_D a < 1$):

$$f(k_D a) = 1 + \frac{(k_D a)^2}{16} - 5 \frac{(k_D a)^3}{48} - \frac{(k_D a)^4}{96} \dots \quad (2.55)$$

en el límite la ecuación queda como, $f(k_D a)=1$, la ecuación de *Hückel*.

- Para valores de $k_D a$ altos, que se dan en medios viscosos ($k_D a > 1$):

$$f(k_D a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2(k_D a)} + \frac{75}{2(k_D a)^2} - \frac{330}{(k_D a)^3} \dots \quad (2.56)$$

en el límite la ecuación queda como, $f(k_D a)=3/2$, la ecuación de *Smoluchowski*.

La magnitud del potencial zeta indica la estabilidad del sistema, observándose que los sistemas coloidales no son estables en el intervalo comprendido entre -30 y +30 mV.

Para medir el potencial zeta se ha utilizado la técnica de *Electroforesis Laser Doppler, LDE*, basada en el principio básico del efecto *Doppler*^[267], que supone la variación de frecuencia de cualquier tipo de onda emitida o recibida por una partícula en movimiento. Esta técnica implica la utilización de un par de haces láser coherentes procedentes de una única fuente y enfocados, mediante unos espejos, hacia un punto concreto de la célula de medida en la cual se cruzan, iluminando las partículas que pasan. Este punto está localizado sobre la capa estacionaria, en el cual el efecto de la electroósmosis es nulo y, por tanto, la velocidad de las partículas se debe únicamente a su velocidad electroforética. Además, en este punto se generan franjas de interferencia de *Young*, de espaciado conocido, con las que interactúan las partículas dispersando luz, cuya intensidad fluctúa con una frecuencia que está relacionada con la velocidad de las partículas. La luz dispersada se recoge mediante un detector enfocado hacia el punto de cruce de los haces, el cual alimenta un correlador digital que determina la función de autocorrelación, a partir del cual se obtiene la movilidad electroforética de las partículas.

Esta técnica permite determinar el potencial zeta de partículas muy pequeñas, desde 5 nm, obteniendo muy buenos resultados, comparados con los obtenidos mediante instrumentos tradicionales, ya que el número de partículas en el volumen de dispersión es muy grande^[268].

2.2.2 Instrumentación

Los experimentos fueron realizados empleando un equipo Zeta Nanosizer modelo ZS de Malvern Instruments (USA) que posee las siguientes características técnicas y cuyo esquema se muestra en la Figura 2.11:

1. Láser coherente de ión He-Ne que opera a una longitud de onda de 632 nm y a una potencia máxima de 10 mW.
2. Un divisor de haz, que divide el haz procedente del láser en dos rayos, uno de los cuales se emplea como haz de referencia y el otro se modula para corregir la velocidad de las partículas que se mueven en el sentido de las franjas de interferencia, lo que permite determinar de forma inequívoca el potencial zeta de las partículas.
3. Dos espejos que orientan los haces procedentes de la fuente hacia la célula de medida. Uno de ellos es móvil y actúa como modulador de uno de los haces, así se mejora la relación señal/ruido, y la señal producida por las partículas de baja movilidad, de modo que la medida sea tan precisa como para las partículas con alta movilidad.
4. Un fotomultiplicador que es un detector muy sensible y funciona en modo de detección unitaria de los fotones.
5. Un correlador digital, que determina la función de correlación mediante una transformada de Fourier, a partir del cual se obtiene la

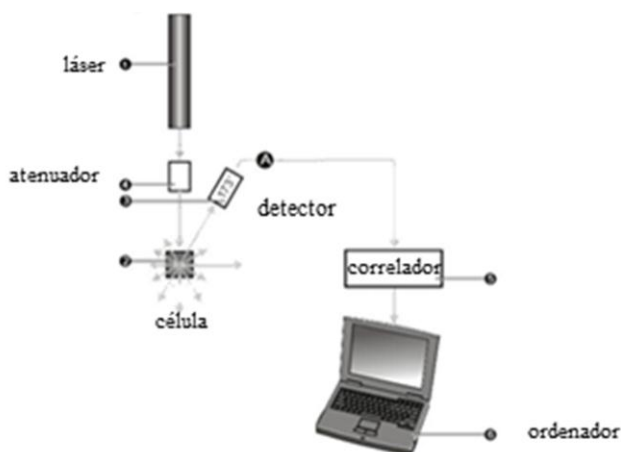


Figura 2.11 Componentes del equipo empleado para medir el potencial zeta.

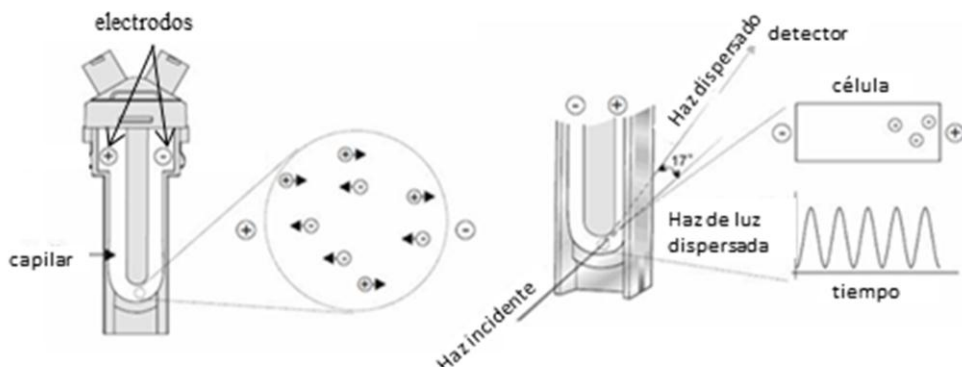


Figura 2.12 Célula de medida y esquema del proceso de medida por LDV. Representación del movimiento de los iones hacia los electrodos en la célula cuando se aplica un potencial, donde la velocidad de los iones es la velocidad electroforética.

movilidad electroforética y el potencial zeta.

Posee un dispositivo de control de temperatura, que permite controlar la temperatura de la célula de medida con una precisión de 0.1°C .

La célula de medida es una célula desechable tipo ZEN1060 (Figura 2.12), que posee dos electrodos a través de los cuales se aplica el campo eléctrico externo. Esta célula se ha calibrado con un patrón de látex, suministrado por el fabricante, de potencial zeta conocido ($\xi = -50 \pm 5 \text{ mV}$).

El equipo está conectado a un ordenador. Tanto el manejo del equipo como el almacenamiento de los datos se llevan a cabo de forma automática mediante el programa suministrado por el fabricante, Malvern.

2.2.3 Metodología

Se comienza con la preparación de la disolución coloidal con la concentración deseada y una vez preparada se introduce con ayuda de una jeringa muy lentamente en la célula, evitando las burbujas de aire que se hayan introducido o se puedan formar en la misma.

Una vez introducida la disolución en la célula, todo el proceso está controlado mediante un programa informático. Este programa necesita como parámetros iniciales el índice de refracción y la absorción que se produce en la disolución a estudiar, la viscosidad y la constante dieléctrica del disolvente empleado (agua, en este caso), la temperatura de trabajo ($25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$), el potencial aplicado, el número de medidas a realizar y la *función de Henry*, $f(k_d a)$, de las partículas estudiadas, que por defecto está establecida en 1.5, es decir, en el límite de *Smoluchowski*.

Cuando la disolución se termostatiza a la temperatura seleccionada, se procede a ejecutar la medida programada. El potencial zeta se obtiene como un promedio estadístico de n medidas independientes, que el programa almacena automáticamente. De estas medidas se desestiman todas aquellas que no se reproducen.

Para el estudio de la variación de la movilidad electroforética con la temperatura realizado para los microgeles, la temperatura se incrementó de 293 a 313 K en pasos de 2 K para bajar de nuevo hasta 293 K, con el fin de saber si la respuesta es reversible.

El potencial zeta depende del pH, de la fuerza iónica (concentración de iones presentes en la disolución) y de la concentración de las moléculas cargadas en el dispersante. El efecto del pH o de la fuerza iónica del medio o la concentración de cualquier aditivo dan información sobre la estabilidad del sistema^[251]. Dada por ejemplo una partícula en suspensión con un potencial zeta negativo, al representar las adicciones de ácido o base al sistema coloidal frente al pH alcanzado para cada caso, se obtiene una curva parecida a una curva de valoración, en la cual los valores altos de pH representarán una mayor carga negativa y, por lo tanto, un potencial negativo, mientras que los pH bajos (ácidos) resultarán en potenciales zeta positivos. El punto en el que el potencial zeta es cero se conoce como *punto isoeléctrico*, IEP, y es el punto más inestable del sistema coloidal. Para una muestra electrostáticamente estabilizada, este punto es aquel en el que la estabilidad debido a las fuerzas repulsivas es muy débil. En los dos extremos de la curva (a pH muy ácido y a pH muy básico), las fuerzas resultantes de la repulsión electrostática deben ser suficientes para evitar la floculación de las partículas en la disolución.

Estas medidas se pueden hacer con ayuda de una bureta automática. El equipo de potencial zeta permite hacer valoraciones automatizadas y preparaciones de muestra completamente automatizadas. Realiza cambios en

las condiciones de muestreo como son el pH, la conductividad y la concentración de la muestra. En el caso del pH, los cambios vienen dados al añadir un ácido o una base. Las medidas están automatizadas, de esta forma se puede fijar el incremento del valor del pH o el volumen añadido de valorante. El protocolo de medida es almacenado en el ordenador como procedimiento de operación estándar (SOP) para asegurar su reproducibilidad^[268].

2.3 FLUORIMETRÍA O ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia permite usar parámetros para identificar la presencia y cantidad de moléculas específicas en el medio^[269]. Además, la polarización de fluorescencia permite analizar perturbaciones en la orientación y movilidad de moléculas fluorescentes que forman parte de los coloides que se desean estudiar. En la actualidad, estas medidas se utilizan mucho para el estudio de membranas en el campo de la biofísica.

2.3.1 Fundamentos

El fenómeno básico en el que se basa la polarización de fluorescencia fue descrito por Einstein en 1906^[270] mediante la ecuación que responde al movimiento Browniano de una partícula en un disolvente

$$K = \frac{RT}{6\eta V} \quad (2.57)$$

donde K es el coeficiente de difusión rotacional de la partícula, V el volumen molar y η la viscosidad del medio.

Para entender los principios de polarización fluorescente se debe tener en cuenta que^[271]:

- La luz es preferentemente absorbida por las sondas cuando el vector del campo eléctrico de la luz de excitación es paralelo al momento de transición de la sonda. La luz de emisión de la sonda funciona de forma análoga.
- Existe un intervalo de tiempo entre la absorción de la luz y la emisión fluorescente denominado tiempo de vida de fluorescencia de la sonda que suele estar en el rango de nanosegundos, picosegundos para la mayoría.

Dicho esto, cuando una molécula se excita con luz polarizada (ver Figura 2.13), el vector del campo eléctrico de la luz emitida será paralelo al vector del campo eléctrico de la luz de excitación si la sonda permanece estacionaria durante el tiempo de vida del estado excitado, es decir, rotaciones de la sonda durante su excitación producirán una despolarización de la luz emitida respecto de la luz de excitación^[99]. Esto es fundamental para la determinación de la movilidad de la sonda en una bicapa lipídica ya que si la sonda tiene su orientación restringida debido a la rigidez de la membrana, la luz emitida será siempre paralela a la luz de excitación^[272, 273].

El parámetro que se mide en espectroscopía por fluorescencia es el factor de anisotropía, r , que refleja el grado de restricción en la movilidad de las sondas, que han sido excitadas, durante el tiempo que están excitadas, r se define como

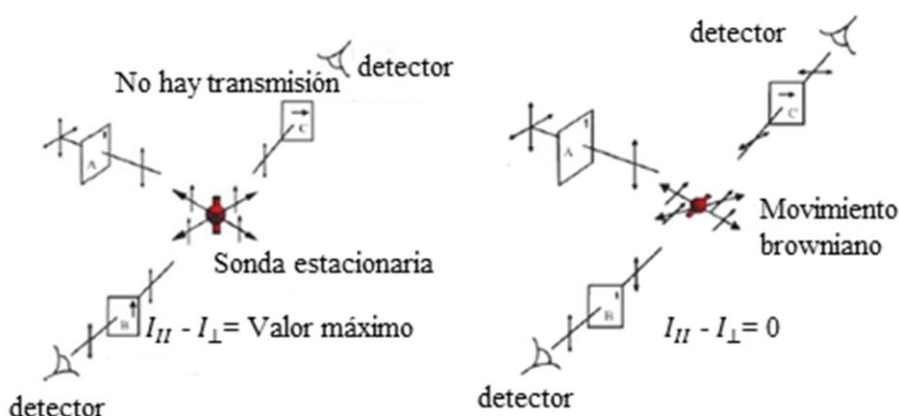


Figura 2.13 Principios básicos de la polarización por fluorescencia. Si la sonda tiene su orientación restringida debido a su localización provocará que la luz emitida sea siempre paralela a la luz de excitación.

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.58)$$

donde I_{\parallel} es la intensidad de la luz cuando los polarizadores de emisión y recepción están orientados paralelamente, e I_{\perp} es la intensidad de luz cuando los polarizadores de excitación y recepción están perpendiculares^[274, 275]. Cuando la molécula está totalmente libre, la diferencia entre $I_{\parallel} - I_{\perp}$ será nula y será máxima cuando la sonda esté inmóvil. Las geometrías de medida posibles se muestran en la Tabla 2.1:

$I_{\parallel} = I_{VV}$. Intensidad de fluorescencia cuando el vector eléctrico del campo eléctrico de luz polarizada y la emisión de fluorescencia son paralelos.

$I_{\perp} = G \cdot I_{VH}$. Intensidad de fluorescencia cuando el vector del campo eléctrico de luz polarizada y la emisión son perpendiculares.

$G = I_{HV}/I_{HH}$. Es el cociente que determina la sensibilidad entre la luz polarizada con vector horizontal y la emitida con vector vertical.

B_{VV} y B_{VH} Intensidades debidas a la muestra sin sonda fluorescente.

$F = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$. Intensidad de fluorescencia total de emisión de la muestra.

$P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$. Ángulo de polarización de la muestra.

El valor máximo teórico de la anisotropía, para una sonda es 0.4 y se encuentra cuando la longitud de onda con la que se excita es próxima a la longitud de onda a la que emite. Los valores experimentales son menores debido a que se produce un solapamiento de los espectros de emisión y excitación de la sonda por la reabsorción de la luz emitida^[271].

De forma general será preciso realizar la corrección de blanco, cuya intensidad del blanco se resta a la intensidad de excitación y emisión. La expresión de anisotropía, queda entonces como:

Tabla 2.1 Posiciones posibles de los polarizadores.

Símbolo	Excitación (Polarizador)	Emisión (Analizador)
I_{VH}	90° (Vertical)	0° (Horizontal)
I_{VV}	90° (Vertical)	90° (Vertical)
I_{HH}	0° (Horizontal)	0° (Horizontal)
I_{HV}	0° (Horizontal)	90° (Vertical)

$$r = \frac{I_{VV} - B_{VV} - G(I_{VH} - B_{HV})}{I_{VV} - B_{VV} + 2G(I_{VH} - B_{HV})} \quad (2.59)$$

La anisotropía está relacionada de forma sencilla con la viscosidad aparente, η_{ap} , del entorno de la sonda. Para una fase homogénea, la viscosidad sigue una función logarítmica del tipo $1/T$ y se relaciona con la anisotropía con una ecuación derivada de la ecuación de Perrin^[276]:

$$r_0 r = 1 + \frac{k_B T \tau}{\eta_{ap} v(r)} \quad (2.60)$$

Dónde r_0 es el valor de la anisotropía cuando la molécula está fija, r , en un medio de viscosidad infinita; τ , el tiempo de vida medio del estado excitado; η , la viscosidad aparente y $v(r)$ el volumen molar rotacional de la sonda, que se supone que sigue un movimiento browniano, k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. Se encontró el valor de r_0 para NBD, 0.297.

2.3.2 Instrumentación

El fluorímetro utilizado es un modelo FP-6500 de Jasco, usa filtros para controlar la longitud de onda del haz incidente. Tiene dos monocromadores, uno que controla la elección de la longitud de onda de excitación y otro que controla el espectro de excitación que va a ser registrado. Posee una óptica de doble haz para compensar las fluctuaciones de corriente en la fuente. La emisión fluorescente es medida a ángulos a la derecha del haz incidente y la

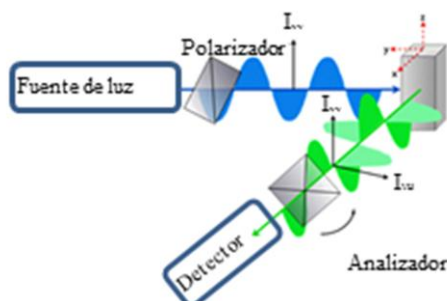


Figura 2.14 (a) Esquema del funcionamiento de un fluorímetro^[4].

radiación emitida pasa a través de un segundo filtro para aislar el pico fluorescente que se mide. El haz incidente pasa a través de un atenuador para reducir su energía hasta conseguir radiación fluorescente. La Figura 2.14 muestra un esquema de su funcionamiento.

La fuente utilizada debe ser más intensa que la utilizada en espectroscopía UV-visible. Los filtros utilizados son lámpara de vapor de mercurio a baja presión que da líneas intensas en algunas longitudes de onda. La necesidad de tener una fuente de radiación continua provoca que un fluorímetro esté equipado con una lámpara de Xenon de alta presión con una potencia de 75-450 W y como la radiación producida es monocromática no hay necesidad de un monocromador de excitación.

A pesar de poseer una fuente intensa, debido a la baja intensidad de la fluorescencia, el equipo posee fotomultiplicadores que son utilizados como detectores^[277].

2.4 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

2.4.1 Microscopía de contraste interferencial (DIC)

Fundamentos

La microscopía de contraste fue desarrollada fundamentalmente por Zernike^[278] en 1932 y se basa en el retraso que se produce en las ondas de luz al atravesar objetos de distintos índices de refracción, aprovechando y amplificando dichos retrasos. Un tipo de microscopía de contraste es la interferencial que también se conoce como Nomarski por su descubridor^[279].

El microscopio de interferencia es una modificación de microscopios de contraste. En este caso la muestra se ilumina con dos haces coherente cuyos planos de polarización forman un ángulo de 90°. En las zonas fronterizas entre áreas con diferente índice de refracción existen diferencias de fase entre los dos haces de luz, de forma que pueden ser utilizados para

incrementar el contraste. En este tipo de microscopios se separa por completo la luz directa de la difractada utilizando prismas^[280].

Instrumentación

Las imágenes DIC fueron tomadas con un microscopio digital Olympus IX71 de amplio campo equipado con una placa de contraste de interferencia diferencial (U-DICT Olympus), y los correspondientes filtros con un objetivo 60X.

El principio del sistema es sencillo, como se observa en la Figura 2.15 el rayo de luz monocromático incide a través del filtro en el condensador completamente abierto y el prisma, que se encuentra dentro de él, genera dos rayos. Estos dos rayos atraviesan de nuevo un segundo prisma colocado después de la muestra, y como su trayectoria óptica es desigual se forma una imagen doble de la muestra lateral y longitudinalmente pero el filtro analizador los transforma en un mismo plano. Es aquí donde ocurre la interferencia, constructiva o destructiva, ocasionada por las diferencias en la trayectoria óptica dentro de la muestra, lo que se manifiesta en la imagen observando áreas más o menos oscuras^[281]. Las partes oscuras de la imagen muestran las porciones de la especie más densas^[282].

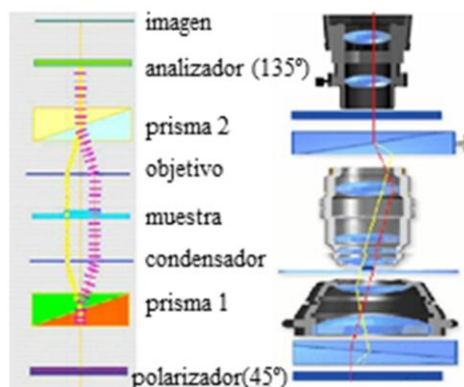


Figura 2.15 Esquema de funcionamiento de un microscopio de contraste interdifereencial. Utiliza filtros de polarización, y prismas Wollaston para separar los caminos de luz que evita cualquier tipo de protocolo de preparación de la muestra^[5].

2.4.2 Microscopía confocal (CLSM)

Fundamentos

La microscopía láser confocal es una técnica de observación que se utiliza mucho en diversas ramas de la ciencia como medicina, biología o geología. A pesar de ser patentada en 1957 por Minsk^[283], la técnica no empieza a desarrollarse hasta principios de los años setenta^[284, 285].

Es una técnica cuya característica fundamental es la capacidad para obtener imágenes enfocadas con gran resolución. Las imágenes son obtenidas punto a punto y reconstruidas digitalmente, lo que permite la reconstrucción tridimensional de muestras topológicamente complejas^[286].

El microscopio confocal permite examinar muestras in vivo, en este caso solo se ilumina el plano fijado por lo que la resolución de la imagen es mucho mejor.

Instrumentación

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal LEICA TCS SP2 AOBS equipado con láser de ión argón ($\lambda=488$ nm) y usando un objetivo LEICA 63X de inmersión de aceite. Se puede seleccionar una o varias longitudes de onda del láser, en el caso de querer visualizar varias sondas^[287].

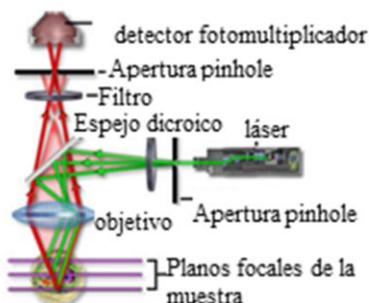


Figura 2.16 Principios de un microscopio confocal. Para obtener una imagen completa, el punto de luz es movido a través de la muestra con ayuda de espejos dicróicos. La luz emitida/reflejada pasa a través de la apertura pinhole y es transformada en señal eléctrica por un fotomultiplicador para poder ser leído en el ordenador^[8].

En la Figura 2.16 se muestran los distintos componenets de un microscopio confocal. Parte de la luz procedente de la fuente de iluminación atraviesa un primer diafragma y es reflejada mediante el espejo dicroico, y con ayuda de la lente se enfoca en un punto de la muestra. La señal emitida en el punto iluminado vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicroico y es enfocada en el detector.

El principio del funcionamiento del microscopio confocal se basa en los dos diafragmas o pinholes, uno situado entre la fuente de luz y el objetivo y el otro entre el objetivo y el detector; ambos deben estar perfectamente alineados de forma que el segundo de ellos deje llegar al detector solo la luz del plano focal. La utilización de láser como fuente de iluminación permite observar una región muy pequeña de la muestra con mucha intensidad. La luz emitida por la muestra es recogida por un fotomultiplicador donde se transforma en señal de vídeo que se digitaliza^[288]. Un microscopio de confocal se utiliza para visualizar partículas fluorescentes de un tamaño menor a 5 μm .

2.5 TÉCNICAS DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA E IÓNICA

La microscopía electrónica se desarrolló a principios del siglo pasado debido a varios estudios entre los que destacan el descubrimiento del electrón como partícula cargada con masa en reposo y sus características con carácter corpuscular y ondulatorio^[289]. A partir de ahí, se comenzaron a desarrollar más estudios hasta construir el primer microscopio electrónico en 1932^[290].

Pueden distinguirse dos tipos generales de microscopía electrónica: la de transmisión, TEM, y la de barrido, SEM, si bien ambas tienen diferentes variantes, entre las que se destacarán, por su utilización en este trabajo; crio-TEM, crio-SEM y FIB que se comentarán más adelante. Para todos ellos, la limitación de resolución óptica viene dada por el criterio de Rayleigh que es una forma sucinta del principio de Abbe^[291] y se expresa de la siguiente forma^[292]:

$$d = \frac{k\lambda}{2n\text{sen}\alpha} = 0.61 \frac{\lambda}{\text{sen}\alpha} \quad (2.61)$$

donde d es la resolución, distancia que debe existir entre dos puntos para que puedan verse como dos entidades distintas, k es la constante del medio de la lente, λ es la longitud de onda de la radiación, n es el índice de refracción del espacio lente-objeto y α es el semiángulo de incidencia^[293]. Para toda lente magnética que focaliza un haz de partículas cargadas la constante de la lente es igual a 1.22. Así se deduce, con la ecuación (2.61)^[294], el límite de resolución que viene determinado por la longitud de onda de la radiación con la que se ilumina el objeto: cuanto menor sea la longitud de onda de la radiación, menor es d y por tanto mayor es la resolución del microscopio.

2.5.1 Microscopía de transmisión

Fundamentos

En la microscopía electrónica el haz de electrones tiene una densidad de corriente uniforme con una energía entre 100 y 200 KeV. Parte de estos electrones son transmitidos, otros son dispersados y otros dan lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz o rayos X. En esta técnica se emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes de la muestra^[295].

Para que tenga lugar la formación de la imagen, debe existir un contraste mínimo o variación de intensidad entre zonas próximas a la que se quiere observar. El comportamiento ondulatorio de los electrones permite observar variaciones tanto en la amplitud como en su fase de onda al atravesar la muestra y ambos tipos de variación dan lugar al contraste en la imagen.

En las imágenes de contraste de amplitud se obtiene imágenes de campo claro o campo oscuro seleccionando mediante diafragmas o aperturas, el haz directo o los haces dispersados, respectivamente. Dentro del contraste de amplitud existen dos tipos de contraste debido al grosor o masa de la muestra y el debido a la difracción de electrones, de los cuales el primero es el más importante^[296].

El contraste debido a la difracción se produce a un determinado ángulo Bragg^[293] y por tanto solo aparece en muestras cristalinas con cierta estructura y orientación. El contraste debido al grosor de la muestra es causa de la dispersión que sufre el haz de electrones al atravesar la muestra y depende del número atómico y del grosor de la muestra^[297].

Instrumentación

La fuente de electrones se produce al calentar un filamento de tungsteno hasta 2700°C a vacío y atraviesa toda la columna del microscopio hasta llegar a la muestra. El condensador está formado por una serie de lentes electromagnéticas que actúan de la misma forma que los espejos con la luz al incidir sobre un campo eléctrico o magnético. El objetivo sirve para obtener la mejor resolución de la imagen^[298]. En la Figura 2.17 se muestran ls principales componentes.

Metodología

La preparación de la muestra es una de las etapas más importantes del procedimiento experimental. Para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es necesaria que ésta sea delgada, es decir, transparente a los electrones, como máximo de 100 nm para que la calidad de las imágenes sea buena. En el caso de muestras biológicas se produce un contraste muy bajo ya que generalmente sus estructuras están formadas por átomos de números atómicos bajos por lo que se preparan con especies

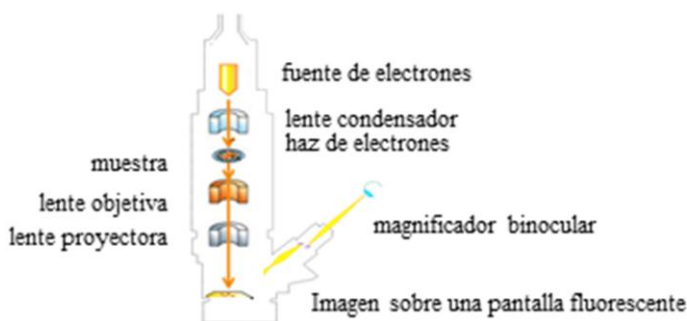


Figura 2.17 Principales componentes de un microscopio de transmisión. Se observa la fuente de electrones, el condensador, el objetivo, el magnificador y la cámara^[2].

químicas más grandes como son los metales pesados.

Después de pasar los electrones a través de la muestra, los que son dispersados son recogidos por un objetivo. De esta forma, la imagen se forma y con sistemas de lentes adicionales posibilita una imagen mejorada.

Se utiliza un recubrimiento muy delgado de algún metal pesado como puede ser acetato de uranilo, ácido fosfotungstánico o molibdato de amonio para proteger la muestra y se evapora una gota de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. Este protocolo se conoce como tinción negativa^[299, 300].

2.5.2 Crio-microscopía electrónica de transmisión

Fundamentos

La *crio-microscopía de transmisión electrónica* se basa en vitrificar la muestra para protegerla del vacío y disminuir el daño por radiación. La diferencia con TEM tradicional radica en la preparación de la muestra pero la base teórica del microscopio es la misma.

Llevando a cabo congelaciones ultrarrápidas se consigue que el agua permanezca en forma vítrea, con lo que no aparecen cristales de hielo que dañen la muestra. Además no impone ninguna limitación teórica a la resolución y la muestra se mantiene en la disolución fisiológica inicial.

Instrumentación

Con el fin de obtener información estructural de los liposomas estudiados se llevaron a cabo experimentos de crio-microscopía de transmisión electrónica (crio-TEM), para los que se ha usado un microscopio *JEOL JEM-1230* (JEOL, Ltd., Japón) similar al mostrado en la Figura 2.18.

En la Figura 2.18 se observa el equipo de crio-TEM utilizado. La fuente de electrones emite con una diferencia de potencial entre 40 y 120 kV. El aumento que tiene las lentes proyectoras es desde 50 hasta 600000. Una vez obtenidas las imágenes se graban en películas Kodak 4489 y Kodak SO-163. A través de toda la columna, los electrones se mueven en vacío para que sólo interaccionen con la muestra a analizar. Para digitalizar las películas



Figura 2.18 Fotografía del microscopio electrónico JEOL JEM-1230 con una capacidad de operación de hasta 120kV. Tiene un bioescáner con cámara. La muestra se coloca en un portamuestras que debe ser criogenizado y para lo que se dispone de una cámara de criogenización.

microfotográficas se utiliza un escáner tipo Dimage Scan Multi Pro (Konica Minolta Europe GmbH, Alemania).

Metodología

Mediante crio-TEM se han caracterizado los liposomas estudiados y la parte principal en esta técnica es la preparación de la muestra, como ya se ha dicho.

Una vez preparadas, las muestras fueron vitrificadas según el método descrito por *Dubochet* y colaboradores^[301] y por *Llorca* y col^[302], que consiste esencialmente en la correcta congelación de la muestra. Durante 1min se aplica una descarga iónica a una rejilla de microscopía electrónica cubierta por una fina capa agujereada de carbón (Agar Scientific Ltd., Reino Unido) con el fin de favorecer la adsorción de la muestra en su superficie. Una pequeña alícuota (5 μ L) de muestra se deposita sobre la rejilla descargada eliminándose el exceso de disolución con papel de filtro durante 5 s. A continuación, la rejilla se congela en etano líquido a -180°C de manera muy rápida (en 18 s aproximadamente) manteniéndose esta temperatura durante todo el procedimiento de medida, usando para ello un portamuestras criogenizado *Gatan* (Gatan Inc., EE.UU.).

Realizando la congelación en un tiempo tan pequeño se consigue que el agua circundante a los liposomas no cristalice, sino que vitrifique de manera amorfa y así no pueda alterar la estructura original de la muestra.

El microscopio se configuró para operar a 100 kV y, con el fin de evitar que la radiación electrónica dañase la muestra, las imágenes se obtuvieron con un ángulo de inclinación de 0° bajo condiciones de dosis mínima. Esta técnica de medida consiste en irradiar la muestra lo menos posible, realizando enfoques previos y correcciones a las aberraciones de las lentes electromagnéticas en áreas adyacentes a la de interés, de tal manera que sólo se irradie en el momento de tomar la micrografía^[303].

Las imágenes obtenidas han sido procesadas y analizadas, que se mostrarán más adelante en Resultados y discusión.

2.5.3 Crio-microscopía electrónica de barrido

Fundamentos

Cryo-SEM es la técnica de microscopía electrónica de barrido que fue utilizada por primera vez en 1960 aunque no fue hasta los 80 en los que comenzó a comercializarse y estar a la disponibilidad de investigadores.

Crio-SEM es una técnica que examina material biológico por debajo de la temperatura ambiente (entre -100 y -200°C), permitiendo que la muestra tenga la misma apariencia y preservando su estructura física y química que posee a temperatura ambiente y así observar la micro y ultraestructura de estos biomateriales sin dañar mucho la muestra.

Las ventajas de técnicas como el crio-SEM es la obtención de imágenes de las intactas estructuras de las partículas que se desean estudiar debido a que cuando se congela la muestra líquida, esto es el agua contenida en el interior de los liposomas, en este caso no le da tiempo a cristalizar tan rápidamente y se mantiene en estado sólido. Además a la hora de preparar la muestra no requiere de ningún tipo de protocolo que modifique la muestra, tal como añadir un fluoróforo por lo que la densidad observada será la que posee la muestra en condiciones normales de temperatura y presión^[304-306].

En este modelo donde está equipado con la técnica de crio-SEM como con la técnica FIB, y ambas se pueden aplicar simultáneamente para una misma zona de la muestra.

La técnica Focused Ion Beam (FIB) ^[307] o haz de iones focalizados utiliza un haz de iones Ga^+ para inspeccionar la superficie de la misma forma que el haz de electrones utilizado en SEM. El haz primario de iones galio golpea la superficie de la muestra y arranca una pequeña cantidad del material, provocando que se generen iones secundarios o átomos neutros sobre la superficie de la muestra. Los electrones secundarios generados (iones) son recogidos para formar una imagen de la superficie de la muestra que se estudia ^[308].

Instrumentación

El instrumento utilizado incluye dos columnas, una con el haz de electrones para crio-SEM y otra con el haz de iones para FIB de la empresa ZEISS ^[309].

En la Figura 2.19 se observa la columna de los electrones que está situada

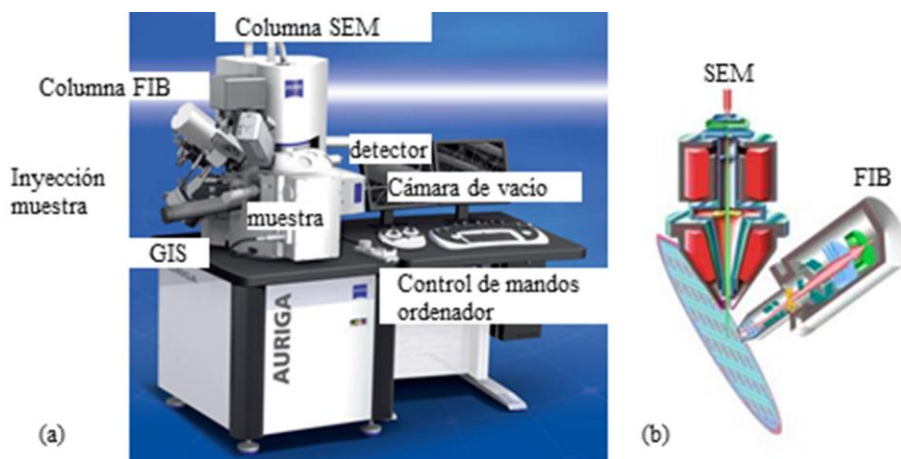


Figura 2.19 (a) Equipo de crio-SEM en una columna GEMINI 4000 con una resolución de 1nm a 15 mV y una columna CANION para FIB con una resolución de 2.5nm a 30 mV. GIS es la estructura por la que se añade el gas para el recubrimiento para medidas con FIB. A través del controlador se obtienen imágenes para ambas técnicas. (b) Representación de cómo están dispuestas la columna SEM y FIB, el ángulo de separación de una con respecto a la otra está establecido en 54° ^[23, 24].

a 54° de la columna de iones. La distancia de trabajo desde el haz de electrones o el de iones hasta la muestra debe ser al menos de 5 mm y la columna GIS que es la responsable de la entrada del gas metálico para recubrir la muestra va a tener cuatro puntos de actividad alrededor de la columna de iones. El vacío al que está sometido la muestra una vez que se introduce en la cámara ensamblada al microscopio es de hasta 10 mbares.

A la hora de movernos a través de la muestra, este equipo posee una rotación posible para los tres ejes xyz. A través de los ejes x e y nos podemos mover hasta 100 mm con un ángulo que puede oscilar desde -10 hasta 60°. En eje z el movimiento será como mucho de 20 mm.

En el caso de la óptica para la columna de electrones, las lentes son de inmersión magnética con un voltaje aplicado posible desde 30 hasta 200 kV. La corriente aplicada será menor a 20 nA y así la resolución mínima será de 0.8 nm.

El equipo de escáner del que se dispone está controlado por el usuario con una resolución mínima de 512x512 hasta una resolución máxima de 3584 x 3094 con una rotación de hasta 360° y una velocidad de escaneo de 50 ns/píxel.

Las imágenes se muestran en un área de 1024 x 884 píxel configurable dependiendo de la resolución que se desee. Las imágenes pueden ser guardadas en formato .tiff, .bmp o jpg, y ya pueden ser analizadas o seleccionadas para ser útiles en la investigación que se lleva a cabo^[310].

Metodología

Para la preparación de muestras se utilizó un portamuestras como el que se muestra en la Figura 2.20 en la que se pueden observar las etapas de preparación de la muestra. El primer paso que se realiza es la congelación de la muestra en un baño de nitrógeno o etano líquido cuyo punto de congelación es de -180°C o etano líquido, y entonces es transferida a una cámara de preparación manteniendo el vacío en su interior para que esté en las mismas condiciones. En esta cámara se procede a recubrir la muestra con un metal para aumentar la conductividad que suele ser generalmente platino. Una vez que se ha recubierto de una forma controlada, ya que se fijan los parámetros de espesor y tiempo digitalmente. Entonces es transferida a la cámara del microscopio, manteniendo siempre la temperatura constante de -180°C con ayuda de N₂ y el vacío.

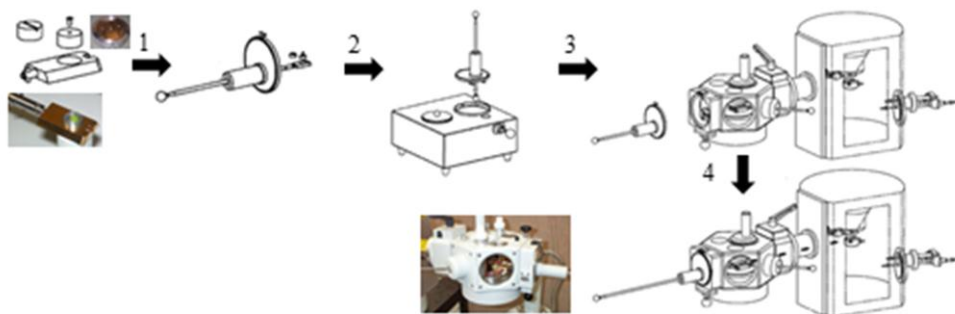


Figura 2.20 Preparación de muestras para crió-SEM y FIB. 1. Portamuestras tipo WSH-FLAT con anclajes para la fijar la muestra, con un volumen mínimo es de 1 µl de muestra que se ensambla en el dispositivo de transferencia. 2. Anclaje del portamuestras sobre el dispositivo de transferencia en la cámara de vacío. 3. Recubrimiento de platino sobre la muestra con un espesor mínimo de 5 nm para aumentar la conductividad de la muestra. 4. Transferencia de la muestra a la cámara de criogenización ensamblado al microscopio para el análisis de la muestra con el microscopio. Todos estos procesos han sido realizados en condiciones de muy baja temperatura pero constante en todo momento^[18].

En la primera parte de la preparación de la muestra, cuando se produce la congelación de la misma, toda el agua congelada queda cubriendo las partículas que se desean observar, por lo que si se elimina parte de esa superficie antes de ser recubierta con el metal es más fácil observarlo, por ello, con ayuda de una punta de metal, es arañada por varias zonas del volumen congelado de la muestra.

Este método de preparación de la muestra es relativamente fácil y económico, una vez que se dispone del equipo pero es la parte más importante del proceso para obtener imágenes de buena calidad con esta técnica, ya que cubre las limitaciones que SEM tiene para muestras biológicas, en los cuales, las imágenes que se obtienen son siempre de muestras secas.

Una vez en el microscopio, todos los parámetros son controlados digitalmente, de forma que se fija el haz de electrones que va a bombardear la muestra y se comienza a explorarla, buscando los lugares óptimos donde

encontrar una estructura intacta de, en este caso liposomas. El software utilizado es el propio del equipo denominado SmartSEM.

Permite obtener imágenes de estructuras delicadas tales como los liposomas. Las imágenes serán almacenadas en formato de imagen y con ayuda del programa Smartiff se puede determinar fácilmente el tamaño de las partículas y analizar propiamente todas las imágenes^[311].

2.6 TÉCNICAS DE SUPERFICIE

2.6.1 Balanza de cuarzo

Fundamentos

En los últimos años, se ha producido un gran progreso en el desarrollo y aplicación de la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) para el análisis de espesores y propiedades mecánicas de películas depositadas tanto desde medios gaseosos como medios líquidos^[312].

El origen de la balanza de cuarzo se debe a los estudios pioneros de Günter Sauerbrey^[313] que empleó resonadores de cuarzo como sensores gravimétricos, el desarrollo posterior de este tipo de dispositivos ha conducido a la aparición de múltiples aplicaciones, científicas y tecnológicas, de esta técnica; tanto para estudios de sistemas en la interfase gas/sensor como líquido/sensor.

La ecuación de Sauerbrey contiene los elementos esenciales que permiten entender la aplicación en gravimetría de la QCM. Esta ecuación describe una relación lineal entre la masa depositada sobre el cristal y el cambio en la frecuencia de resonancia, válida para películas sólidas y muy delgadas. La ecuación de Sauerbrey puede expresarse como,

$$m_f = -C \frac{\Delta f}{\nu} = -Z_q \frac{\Delta f}{2\nu f_f^2} \quad (2.62)$$

donde m_f es la masa depositada sobre el sensor, $C = Z_q/(2f_0^2)$ es un factor de sensibilidad dependiente del cristal utilizado, siendo el valor $17.8 \text{ ng}\cdot\text{s}^{-1}$ para los cristales usados en esta tesis, Δf es el cambio de frecuencia del cristal de cuarzo al adsorberse material, v es el número de armónico, f_f es la frecuencia fundamental del cristal de cuarzo (aproximadamente 5 MHz para los cristales utilizados) y $Z_q = 8.8 \cdot 10^6 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ es la impedancia del cristal de cuarzo que se puede definir según la siguiente expresión,

$$Z_q = \rho_q \mu_q \quad (2.63)$$

donde ρ_q es la densidad del cuarzo ($2.65 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y μ_q es el módulo de cizalla del cristal de cuarzo ($2.95 \cdot 10^6 \text{ N}\cdot\mu\cdot\text{cm}^{-2}$).

Los cristales de cuarzo experimentan tres modos acústicos, de diferente velocidad, polarización y acoplamiento piezoeléctrico, dichos modos se suelen ordenar en función de la velocidad de la onda, siendo “a” el de velocidad más rápida y “c” el modo de velocidad más lenta. Debido a la existencia de dos electrodos en las superficies principales del cristal, se puede excitar los tres modos acústicos, que están asociados con propagación de ondas en la dirección normal al cristal. Las condiciones límite establecidas en la parte superior e inferior del cristal junto con la velocidad del sonido en el cristal definen la frecuencia de resonancia.

La reflexión coherente de las ondas de sonido en las superficies superior e inferior del cristal conduce a una serie de ondas acústicas estacionarias entre estas dos superficies del cuarzo. Dada la naturaleza piezoeléctrica del cuarzo existen, por cada modo de oscilación, dos juegos de frecuencias de resonancia acústica, que dependen de las condiciones eléctricas de contorno. El primero denominado antiresonancia (resonancia en paralelo), corresponde al cristal en condiciones de circuito abierto, mientras que el segundo juego de frecuencias de resonancia corresponde al cristal en condiciones de cortocircuito y corresponde a lo que propiamente se conoce como resonancia (resonancia en serie). Las diferencias entre una y otra provienen de la rigidez piezoeléctrica, acompañada por diferencias en la velocidad del sonido. Las frecuencias de antiresonancia de los tres modos acústicos se encuentran completamente desacopladas y viene dadas por,

$$f_m = v \frac{v_m}{2h_q} \quad (2.64)$$

donde v_m es la velocidad de la onda correspondiente al modo m , h_q es el espesor del cuarzo, y v es el número de armónico (en los cristales de cuarzo al excitar la resonancia de la frecuencia fundamental, aparecen armónicos en los múltiplos impares de dicha frecuencia), solo siendo válidos los armónicos impares, dado que los pares no pueden ser excitados bajo condiciones de carga simétrica. La frecuencia resonante lleva a su vez asociado una disipación que va a ser medida^[314].

La disipación del cristal o inversa del vector de onda es medida para grabar la respuesta del cristal oscilando libremente. En 1966 Spencer y Smith^[315] estudiaron la amplitud de la oscilación del cristal de cuarzo y su decaimiento tenía forma de exponencial sinoidal. Como las capas estudiadas son delgadas, el efecto es mucho mayor y de esta forma se podrá obtener información sobre las propiedades viscoelásticas de las capas adsorbidas. El cambio en la disipación es la diferencia de espesor de la superficie antes y después de la adición de la muestra, sea polímero o liposoma en el caso de esta tesis^[316].

Instrumentación

El equipo empleado en esta tesis ha sido una Microbalanza de Cristal de Cuarzo Disipativa (D-QCM) modelo Z-500 de KSV (Finlandia) que permite

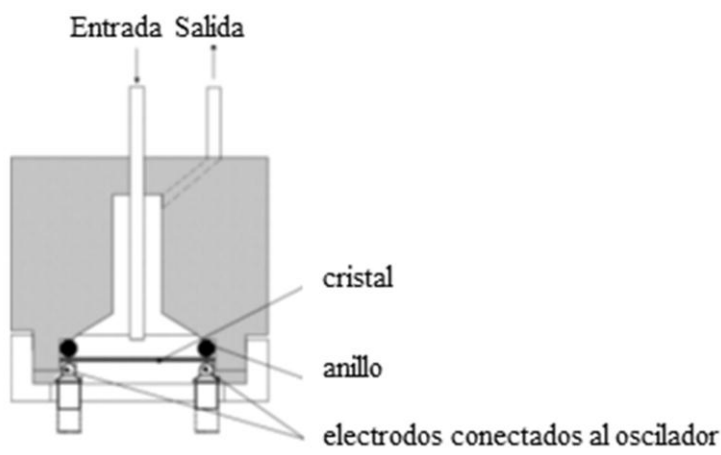


Figura 2.21 Esquema del funcionamiento de la QCM^[6]. Por la entrada se introduce la disolución a estudiar y tras el tiempo necesario de estabilización se introduce el disolvente de lavado. La cantidad adsorbida antes y después del lavado es lo que se va a medir.

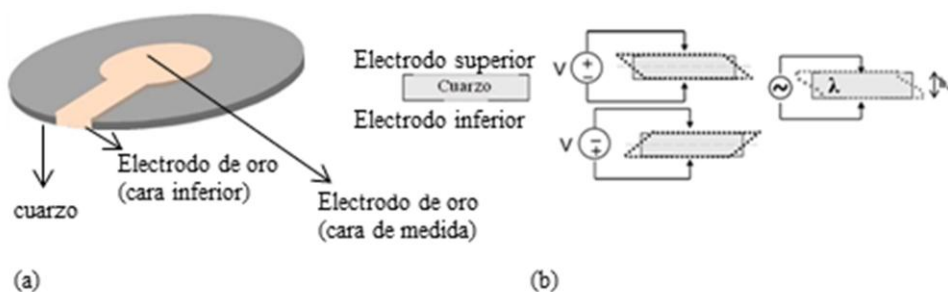


Figura 2.22 a) Cristal de cuarzo recubierto con dos electrodos de oro en la cara inferior y superior. (b) Funcionamiento de una balanza con electrodo de oro formando el circuito.

realizar medidas del proceso de adsorción y crecimiento de películas en disolución. La Figura 2.21 muestra un esquema de su funcionamiento.

La parte esencial del electrodo es un cristal de cuarzo que se encuentra entre dos electrodos, uno en la parte superior y otro en la parte inferior del cristal, que generalmente son de oro, siendo la parte activa del equipo. El electrodo inferior actúa como contacto eléctrico con el resto del circuito oscilador y el superior es la zona donde se deposita el material (Figura 2.22).

Utiliza cristales con diámetro de 14 mm (corte AT) y permite hacer medidas de la frecuencia fundamental, alrededor de 5 MHz, y de sus correspondientes armónicos impares hasta el 11. Al aplicar una diferencia de potencial sobre este tipo de cristales se excita su oscilación en el modo de cizalla con una longitud de onda, λ , propagándose a lo largo del espesor del cristal. Se han utilizado electrodos con recubrimiento de sílice comerciales, con un espesor aproximado de 5 nm^[317, 318].

Metodología

Inicialmente se hablará de los sustratos planos utilizados y los tratamientos previos que deben hacerse antes de las medidas. Uno de los sustratos son los electrodos con recubrimiento de oro que no presentan carga superficial apreciable, siendo preciso realizar un proceso de tiolización de los mismos, previa a la construcción de las películas. Este proceso se llevó a cabo mediante el autoensamblado (SAM) de una capa de tiol sobre el oro. En los estudios realizados se empleó 3-mercaptopropanosulfonato de sodio (HS-

(CH₂)₃-SO₃⁻ Na⁺. Para la disolución del tiol (saturada) se empleó etanol absoluto (Quimivita). La funcionalización se produce por inmersión del sustrato en la correspondiente disolución durante un periodo de al menos 24 horas; la adsorción es casi completa tras la primera hora, pero alargando el tiempo de adsorción se obtiene un SAM con menor número de defectos y por lo tanto con una densidad de carga más homogénea¹. La densidad de carga de nuestras superficies tiolizadas es del orden de 10⁵ cargas*cm⁻² (determinada, empleando la microbalanza de cristal de cuarzo para obtener la masa de tiol depositada). Tras el proceso de tiolización del oro, la superficie se lava con una disolución de HCl y después abundantemente con agua de mili-Q. El otro electrodo utilizado posee una capa muy fina de silicio, donde la carga superficial se consigue generalmente con un tratamiento con mezcla piraña (altamente oxidante) previo a su empleo.

El análisis de los datos experimentales obtenidos con la técnica D-QCM se realizó empleando el paquete comercial QCM-Z *Browse*. Este software realiza una minimización de las diferencias existentes entre la impedancia experimental y la calculada, mediante el algoritmo de Levenberg-Marquard^[319-321].

2.6.2 Elipsometría

Fundamentos

La elipsometría es una técnica óptica utilizada desde finales del siglo XIX, para el estudio de capas y de propiedades ópticas de un material, aunque el nombre de elipsometría fue dado por Alexander Rothen^[322] en 1945. Las propiedades medibles con esta técnica son el índice de refracción y la absorción de la luz o coeficiente de absorción, mediante el cambio de polarización que sufre la luz reflejada por la muestra^[323].

La elipsometría se basa en la irradiación (fuente de luz bien definida) de un material y la captura de la reflexión que en el material se produce. El rayo incidente pasa a través de un polarizador para asegurar que es luz coherente y justo después atraviesa el compensador que sirve para que la luz polarizada sea elíptica^[324].

El análisis se realiza teniendo en cuenta la ley de Snell que describe que cuando un haz incide sobre un material, parte de ella se refleja. La

diferencia entre la que se refleja inmediatamente y la que se transmite nos da la información del espesor de la muestra objeto de estudio.

En la radiación, tanto incidente como reflejada, existe una diferencia de fase entre las componentes paralela y perpendicular, dicha diferencia de fase se denota por δ , utilizando el subíndice 1 para el haz incidente y 2 para el haz reflejado. La diferencia en la fase, entre el haz incidente y el reflejado, permite definir el primer ángulo elipsométrico delta, Δ , que puede tomar valores entre 0 y 360°.

Además de la diferencia de fase, también la amplitud de las componentes de la luz puede cambiar tras la reflexión y este cambio se define con el ángulo psi, Ψ , según la (2.65). Este ángulo elipsométrico puede variar entre 0 y 90°.

$$\tan \Psi = \frac{|R^p|}{|R^s|} \quad (2.65)$$

Estos dos ángulos son los que se obtienen en las medidas experimentales de elipsometría.

La ecuación fundamental de la elipsometría viene dada por la razón compleja de los coeficientes de reflexión totales, ρ , según la expresión que se muestra a continuación,

$$\rho = \frac{R^p}{R^s} = e^{\Delta} \tan \Psi \quad (2.66)$$

Esta ecuación relaciona los ángulos elipsométricos Δ y Ψ con los coeficientes de reflexión total^[325].

Instrumentación

Todos los experimentos fueron realizados empleando el elipsómetro modelo EP³ de la empresa Nanofilm (Alemania). La fuente de radiación del elipsómetro es un láser de Nd-YAG con una longitud de onda de 532nm (verde) y potencia máxima de 50 mW (en los experimentos realizados en la interfase líquido/sólido se empleó una potencia del ~ 2%).

En este equipo las medidas elipsométricas se pueden realizar en función del ángulo de incidencia, pero para los experimentos realizados durante la construcción *in situ* de las multicapas, las medidas han sido realizadas a un

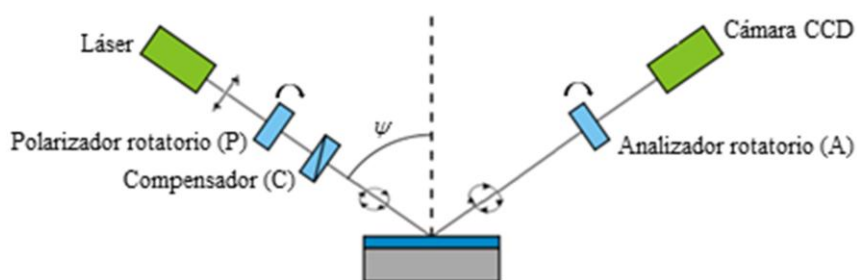


Figura 2.23 Esquema de un elipsómetro. Los ángulos que se obtienen del polarizador y del analizador se denominan como P y A, respectivamente^[1].

ángulo fijo de 60° , impuesto por el diseño de la célula de medida. En la Figura 2.23 se muestra un esquema del elipsómetro empleado.

Como podemos observar en la Figura 2.23, el elipsómetro está formado por una fuente de luz; polarizadores que son elementos ópticos que tienen un eje preferente de polarización; el analizador que es igual que el polarizador pero se emplea para determinar el estado de polarización; la cámara CCD que servirá como detector y QWP o placa de cuarto de longitud de onda (también se denomina retardador o compensador) que es un elemento óptico anisotrópico, lo que implica que en función de su orientación las componentes de la onda incidente salen a distinta velocidad. Generalmente antes de llegar las componentes de la onda al compensador están en fase, sin embargo, al salir emergen fuera de fase (elípticamente polarizadas).

Metodología

El equipo utilizado en esta tesis es del tipo de anulación, así la luz monocromática y linealmente polarizada procedente del láser se hace pasar a través del polarizador y de la placa $\lambda/4$. La elipticidad provocada por la placa $\lambda/4$ compensa la producida por reflexión en la superficie, de tal forma que la luz que llega al analizador será linealmente polarizada, ocurriendo lo mismo en el polarizador, por lo que en la práctica se usará el valor promedio de las distintas zonas del polarizador y del analizador donde la intensidad de la luz en el detector es mínima.



Figura 2.24 Modelo de cuatro capas empleado para el análisis de los datos elipsométricos.

Para el análisis de los datos, se realiza un ajuste de los ángulos elipsométricos Δ y Ψ a un modelo de interfase concreto (una o varias capas) caracterizado por el espesor e índice de refracción de cada capa. En esta tesis se ha utilizado un modelo de cuatro capas (ver Figura 2.24) para describir las películas depositadas desde disolución sobre un sustrato sólido.

La primera capa corresponde al sustrato de los experimentos elipsométricos que es el Si, con un índice de refracción $n=4.1653-0.049i$, la segunda capa es la capa de óxido nativa cuyo índice de refracción es $n=1.4653^{[326]}$, y su espesor se obtiene del análisis de los datos elipsométricos antes de la adsorción. La capa externa (capa cuarta) fue la disolución para la que se supone un índice de refracción constante e igual al de la disolución polimérica. La capa 3 corresponde a la capa de polímero o liposoma (monocapa o multicapa) que se adsorbe sobre el sustrato.

Una vez seleccionado el modelo se pasó a la resolución numérica y para lo cual se empleó una rutina de minimización numérica tipo Simplex, ajustando la elipticidad a partir de las ecuaciones de Fresnel, siguiendo el formalismo planteado por Drude^[327]. El programa iterativo resuelve dichas ecuaciones minimizando las diferencias entre los valores de Δ y Ψ experimentales y calculados, y a partir de esta minimización se extraen los mejores valores para el espesor y el índice de refracción^[328, 329].

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Fosfolípidos

Todos los fosfolípidos utilizados en este trabajo fueron comprados a Avanti Polar Lipids Inc. con una pureza del 99%. A temperatura ambiente son sólidos en forma de polvo y son solubles en disolventes orgánicos; tienen una temperatura de almacenamiento de -20°C .

Los lípidos usados se muestran en la Figura 3.1, y sus características principales se numeran en la Tabla 3.1. Como se observa en la figura, los

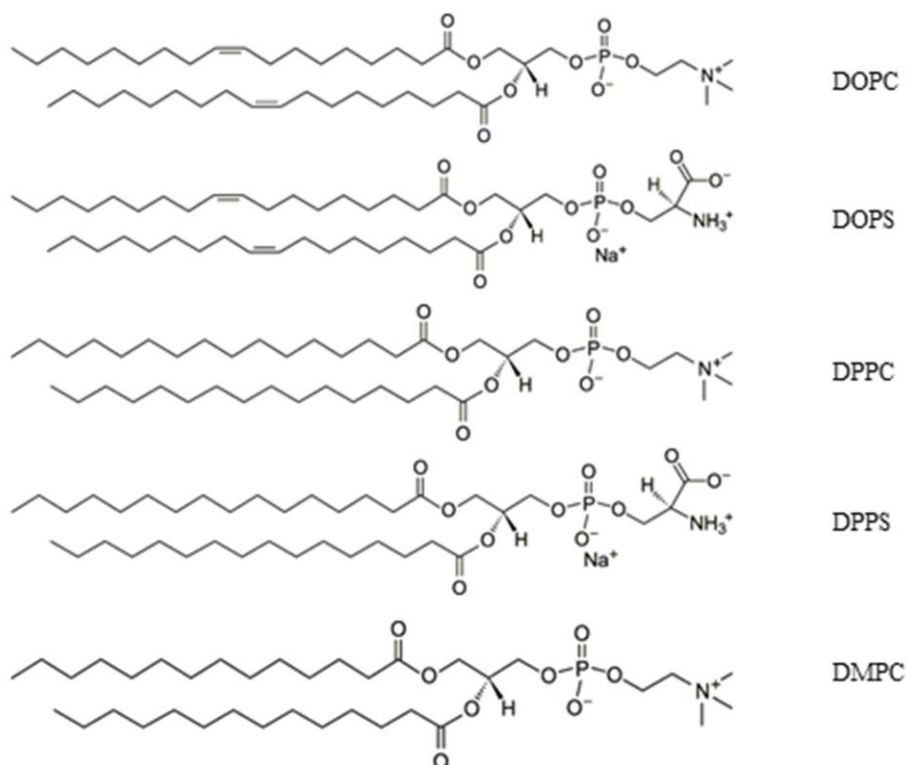


Figura 3.1 Fosfolípidos utilizados en este trabajo. La diferencia entre ellos radica principalmente en la existencia o no de dobles enlaces en su cadena y en el tipo de cabeza polar. Los nombres de los lípidos se dan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Características principales de los lípidos usados.

Nombre fosfolípido	Acrónimo	Cadena molecular	T _m (°C)	M _w (g·mol ⁻¹)	Tipo
1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DOPC	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	-20	786.113	Insaturado zwitteriónico
1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (en sal sódica)	DOPS	C ₄₂ H ₇₇ NO ₁₀ PNa	-20	810.025	Insaturado negativo
1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DMPC	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	23	677.933	Saturado negativo
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (en sal sódica)	DPPS	C ₃₈ H ₇₃ NO ₁₀ PNa	54	757.950	Saturado negativo
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DPPC	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	41	734.039	Saturado zwitteriónico

lípidos DPPC, DPPS y DMPC poseen cadena de carbonos sin ninguna insaturación, es decir, sin dobles enlaces mientras que el DOPC y el DOPS poseen una insaturación en cada una de las cadenas. Se han elegido estos fosfolípidos por las importantes diferencias en su temperatura de transición, T_m , lo que confiere diferencias notables en la flexibilidad de las membranas liposomares. La combinación de dos de ellos permite un alto margen para variar dicha flexibilidad, así como la carga superficial del liposoma, lo que resulta de gran importancia al recubrirlos con polielectrolitos.

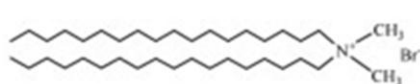
Dadas las características de estos lípidos se han combinado para formar distintos tipos de liposomas. Por un lado se han formado liposomas de DOPC y DPPC, y por otro lado las siguientes combinaciones: DOPC:DOPS, DMPC:DPPC, DMPC:DPPC:DPPS y DOPC:DODAB. De esta forma se ha conseguido estudiar liposomas en función de la carga y de la insaturación de las cadenas, lo que ha dado lugar a liposomas de los siguientes tipos: insaturados positivos, insaturados zwitteriónicos, insaturados negativos, saturados negativos y saturados zwitteriónicos. Los lípidos derivados de las colinas han sido seleccionados por su mayor interés biológico y las mezclas han sido realizadas para que sirvan de modelo de comportamiento.

3.1.2 Tensioactivos

Los tensioactivos utilizados en este trabajo han sido dos: Triton X-100 que nos sirve de ayuda para destruir los liposomas en el estudio de funcionalidad de los mismos y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DODAB) para formar liposomas en combinación con DOPC y proporcionar al liposoma carga positiva. Ambos se muestran en la Figura 3.2.

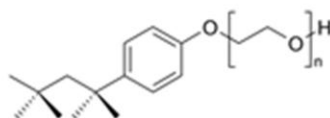
El DODAB, disponible en Avanti Polar Lipids Inc. con una pureza del 99%, es una sal de amonio cuaternario de doble cadena con una temperatura de transición a 45°C y una de pre-transición a 36°C.

El Triton X-100 proporcionado por Sigma-Aldrich (con grado de pureza de laboratorio) es un tensioactivo no iónico con un grupo hidrofílico de óxido de polietileno y una cadena hidrofóbica que a temperatura ambiente es muy viscoso. Es un producto muy utilizado en la degradación de liposomas ya que cuando entra en contacto con los mismos rompe con facilidad las estructuras formadas por los lípidos.



DODAB

Bromuro de dimetildioctadecilamonio
 $C_{33}H_{50}BrN$, $M_w = 630.95 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$



TRITON X-100

Polietilenglicol p-(1,1,3,3tetrametilbutil)-fenil éter
 $(C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n)$; $M_w = 624 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Figura 3.2 Tensioactivos utilizados, DODAB para formar liposomas y TRITON X -100 para disolver los liposomas.

3.1.3 Polímeros y microgeles

Hablaremos inicialmente de los polímeros utilizados para el recubrimiento de los liposomas, que se muestran en la Figura 3.3 y cuyas características principales se detallan en la Tabla 3.2. Las multicapas se han formando usando pares de estos polielectrolitos: PSS/PAH, PSS/PDADMAC.

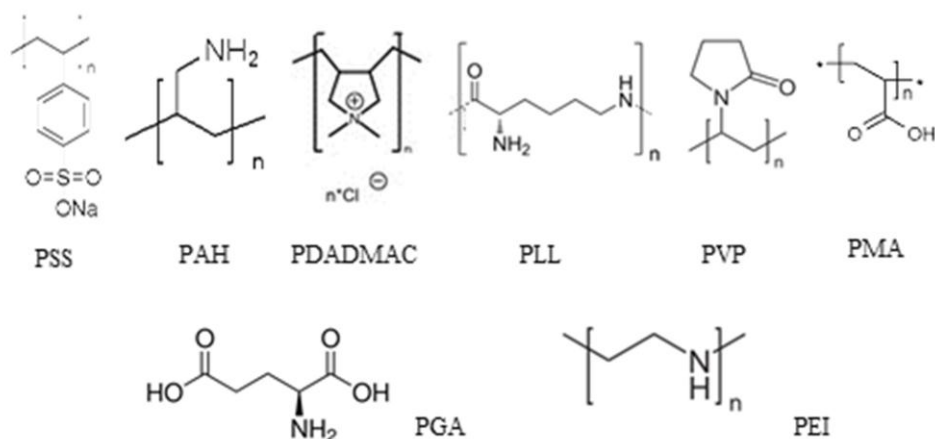


Figura 3.3 Polímeros utilizados para el recubrimiento de los liposomas por la técnica capa a capa.

Para los experimentos de dispersión de neutrones se empleó la forma deuterada del PSS, poli(4-estirensulfonato de sodio perdeuterado), obtenida de Polymer Source (Canadá); dicho polímero se representa abreviadamente como $\text{d}_7\text{-PSS}$, teniendo un peso molecular de 55000 g/mol.

Los estudios más detallados fueron realizados con el par PSS/PAH. El PSS presenta un aspecto pulverulento de coloración blanca, con peso molecular de $70000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, y con 340 monómeros por mol y cada monómero con un peso de $206.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, además es soluble en agua y en algunos glicoles, con una pureza del 99%. El PAH, cuyo aspecto es amarillento cuando está en disolución acuosa, está disponible en forma de

Tabla 3.2 Polielectrolitos independientes del pH.

Nombre polielectrolito	Acrónimo	Fórmula molecular	M_w ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Tipo
Poli-estirensulfonato de sodio	PSS	$(\text{C}_8\text{H}_7\text{NaO}_3\text{S})_n$	70000	Anión fuerte
Poli-alilamina	PAH	$(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{NH}_2))_n$	65000	Catiónico débil
Poli-dialil-dimetilamonio de cloro	PDADMAC	$(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}\cdot\text{Cl})_n$	100000	Catiónico fuerte

Tabla 3.3 Polielectrolitos dependientes del pH.

Nombre polielectrolito	Acrónimo	Fórmula molecular	M _w (Da)	Tipo
Ácido L-poliglutámico	PGA	HO ₂ CCH ₂ CH ₂ CH(NH ₂)CO ₂ H	17000	Aniónico
Poli-L-lisina	PLL	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO ₂ H	32600	Catiónico
Polivinilpirrolidona	PVP	(C ₆ H ₉ NO) _n	10000	Catiónico
Poli-etilenimina	PEI	H(NHCH ₂ CH ₂) _n NH ₂	75000	Catiónico

disolución con una concentración de 20%w en agua. Cada monómero de PAH pesa 57.09 g·mol⁻¹. PDADMAC, está disponible en disolución acuosa con una concentración de 35%w en agua.

La Tabla 3.3 muestra los otros polielectrolitos usados son débiles, y por tanto su densidad de carga depende del pH. Los pares de electrolitos usados han sido PGA/PLL (en este caso fue preciso usar PEI en uno de los sistemas como primera capa adsorbida), PMA/PVP estudiados a diferentes pH y concentraciones salinas. Todos estos polímeros fueron suministrados por Sigma-Aldrich y sin ningún tratamiento previo a su utilización.

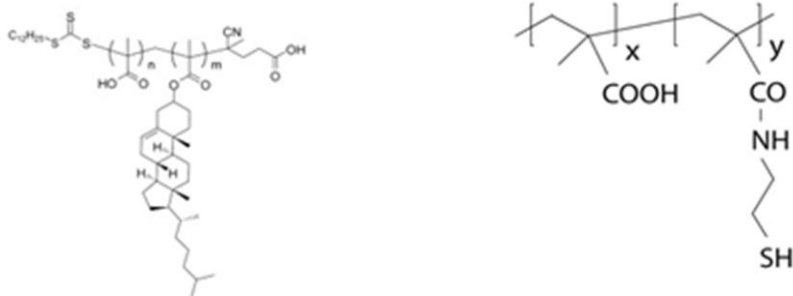


Figura 3.4 Polielectrolitos sintetizados en el laboratorio. PMA_c o ácido de polimetacrilato con 12%w colesterol, M_w = 11560 Da; es un polímero con cadenas de colesterol que sirve para formar parte de la bicapa lipídica que forma los liposomas, es sintetizado por el Dr. Alexander Zelikin^[13]. PMA_{SH} o ácido de polimetacrilato con 12-14%w grupos tioles que es otro polímero que se sintetiza en el laboratorio, pero que debe obtenerse en el momento en que se va a utilizar ya que pierde actividad con el tiempo.

Tabla 3.5 Reactivos necesarios para la fabricación de PMA_{SH}

Nombre reactivo	Acrónimo	Fórmula molecular	M _w /g·mol ⁻¹	Casa comercial
Ácido polimetacrílico en sal sódica (30%w en agua)	PMA	(C ₄ H ₆ O ₂) _n	15000	Polysciences
Piridina ditioetilenamina hidroc lorada	PDA-HCl	C ₇ H ₁₁ ClN ₂ S ₂	222.8	Shanghai Speed Chemical
1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida hidroc lorado	EDC	C ₈ H ₁₇ N ₃ ·HCl	191.7	Sigma-Aldrich

Otros polímeros utilizados contienen cadenas modificadas y dependientes del pH, son (PMA_{SH})^[330], preparado in-situ, y PMA_c, sintetizado en el laboratorio^[13] y se muestran en la Figura 3.4.

El polímero modificado con grupos tioles, PMA se sintetizó a partir de los reactivos que se muestran en la Tabla 3.5.

Las características del polímero derivado del p-(NIPAM), utilizado para conferir termorrespuesta tras ser incorporado mediante en la bicapa lipídica, y del PEG adsorbido mediante una reacción química se resumen en la Tabla 3.4. Fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y sin tratamiento previo.

Para la fabricación del microgel se utilizaron los reactivos mostrados en la Figura 3.5 y sus características se detallan en la Tabla 3.6. Todos estos reactivos fueron utilizados sin ninguna purificación previa.

Tabla 3.4 Polímeros comerciales de Sigma-Aldrich derivado del p-(NIPAM) con cadenas terminales de -COOH y derivado del polietilenglicol.

Nombre polímero	Acrónimo	Fórmula molecular	M _w (Da)
Poli-(N-isopropilacrilamida), con cadenas de ácido carboxílico en posiciones terminales	p-(NIPAM)-COOH	(C ₆ H ₁₁ NO) _n SCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	2000
Amino poli-etilenglicol	NH ₂ -PEG	H ₂ NCH ₂ CH ₂ (CH ₂ CH ₂ O) _n CH ₃	2000

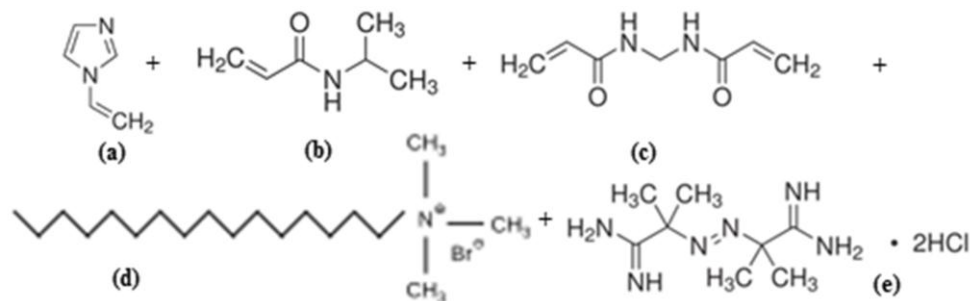


Figura 3.5 Reactivos utilizados para la fabricación del microgel donde (a) es el co-monómero VI, (b) es el NIPAM, (c) es BIS que actúa como entrecruzador, (d) es el surfactante, CTAB, (e) es V50 que actúa como iniciador de la polimerización.

Tabla 3.6 Descripción detallada de los reactivos necesarios para la fabricación del microgel p-(NIPAM)-co-VI

Nombre reactivo	Acrónimo	Fórmula molecular	M _w (g/mol)	Casa comercial	Pureza (%)
1-Vinil-imidazol	VI	C ₅ H ₆ N ₂	94.11	Sigma- Aldrich	99
2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro granular	V50	[=NC(CH ₃) ₂ C(=NH)NH ₂] ₂ ·2HCl	271.19	Sigma- Aldrich	97
Bromuro de N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio	CTAB	((C ₁₆ H ₃₃)N(CH ₃) ₃ Br	364.46	AppliChem	
N,N'-Metilenbisacrilamida	BIS	(CH ₂ =CHCONH) ₂ CH ₂	154.17	Merck	≥99.5
N-isopropil-acrilamida	NIPAM	H ₂ C=CHCONHCH(CH ₃) ₂	113.16	Acros Organics	≥99

3.1.4 Sondas fluorescentes

Las sondas fluorescentes han sido utilizadas para técnicas como el microscopio confocal y citometría de flujo. Del grupo de las Alexa Flúor, AF_{maleimida}-633 (Alexa Flúor ácido carboxílico succimidol, 1200 g/mol), y AF_{maleimida}-488, ambos suministrados por Invitrogen, fueron elegidas para visualizar las nanocápsulas poliméricas de 300 nm. Los Quantum Dots son la mejor forma de observar los liposomas incluso en microscopía de contraste. Las otras sondas utilizadas se muestran en la Figura 3.6.

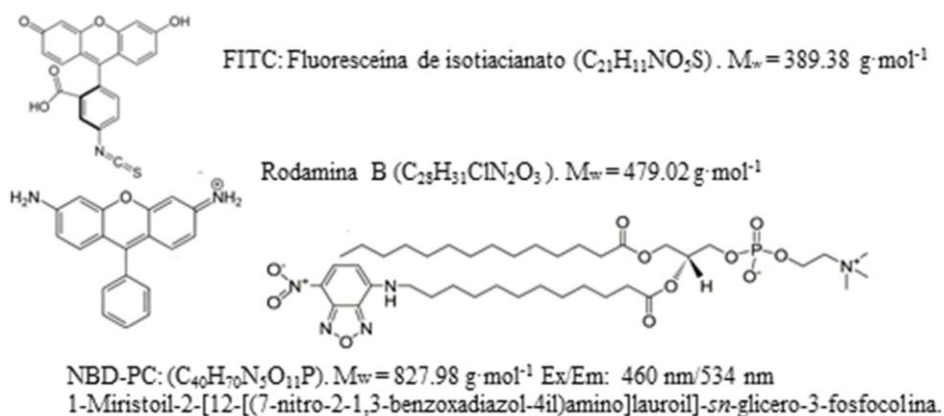


Figura 3.6 Sondas fluorescentes, de las cuales FITC acompaña al fármaco encapsulado, Rodamina B (Sigma-Aldrich, contenido de sonda ~ 95%) a los microgeles y NBD-PC (Avanti Lipids) es una fosfocolina con la sonda fluorescente verde NBD que facilita la observación de los liposomas con el microscopio de confocal

3.1.5 Productos encapsulados

Se han encapsulado los siguientes fármacos suministrados por Sigma-Aldrich y cuya estructura se muestra en la Figura 3.7:

DEX-FITC, (relación de componentes DEX:FITC, 1:250) es un polisacárido complejo y ramificado formado por moléculas de glucosa. Se utiliza en medicina para el tratamiento de enfermedades hematológicas y en aplicaciones biomédicas, debido a su biocompatibilidad, a su coste relativamente bajo, a su carácter hidrofílico y a su facilidad de modificación.

DOX-HCl: Doxorubicina hidrociorada (Sigma-Aldrich, 98-102% HPLC), es un medicamento que inhibe la multiplicación de células tumorales ya que se intercala entre las parejas de bases de la doble hebra de ADN para inhibir la síntesis de ácidos nucleicos. Se utiliza para el tratamiento del carcinoma y diferentes tipos de leucemias. A pesar de sus propiedades terapéuticas, es muy tóxico cuando entra en contacto con el cuerpo humano, provocando

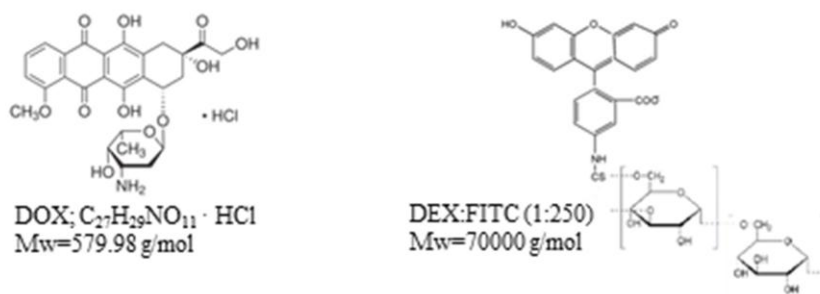


Figura 3.7 Estructura molecular de la doxorubicina y del dextrano

numerosos efectos secundarios. Por esta razón se investiga sobre diferentes tipos de encapsulación del mismo. Un ejemplo de fármaco encapsulado es Doxil, que en los años 90 se encontraba en el mercado americano.

La enzima encapsulado en liposomas utilizado como modelo de encapsulación es la **β -lactamasa** (Sigma-Aldrich con 67.84% de proteína), que constituye un grupo heterogéneo de enzimas, que reacciona con el sustrato nitrocefina (proporcionado por Calbo Chem.). La β -lactamasa produce la reacción de hidrólisis, y da lugar a un cambio de color que permite el seguimiento de la reacción (Figura 3.8).

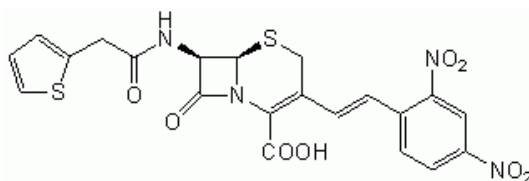


Figura 3.8 Estructura molecular del sustrato, nitrocefina que reacciona con β -lactamasa.

3.1.6 Entrecruzadores

Se han utilizado tres entrecruzadores: 1,4-ditio-DL-treitol, DTT (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), para activar los grupos tioles del polímero; el reactivo homobifuncional bismaleimidodietilenglicol, BM(PEG)₂, (proporcionado por Piercenet y utilizado sin purificación posterior) que no es biodegradable,

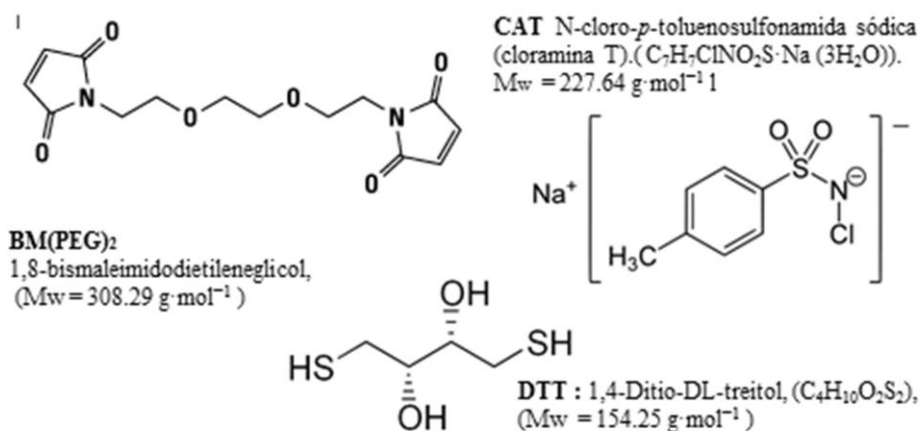


Figura 3.9 Entrecruzadores más utilizados en este trabajo. BM(PEG)₂ es un reactivo homobifuncional no degradable y CAT, entrecruzador biodegradable. Ambos utilizados para formar enlaces disulfuro a partir de los enlaces -SH. DTT rompe los enlaces disulfuro formados para activar los enlaces -SH.

y N-cloro-*p*-tolueno sulfonamida sódica hidratada, CAT (Sigma-Aldrich, 98% w), que sí lo es. Estos dos últimos se usan para crear enlaces disulfuro. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 3.9.

Para el estudio funcional de los sistemas formados, (degradación de las nanocápsulas), se usó glutatona, GSH (C₁₀H₁₇N₃O₆S), proporcionado por Sigma-Aldrich con una pureza ≥ 98%. Con un peso molecular de M = 307.32 g·mol⁻¹.

GSH sirve como reductor, se conjuga con los fármacos para hacerlos más

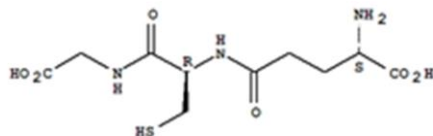


Figura 3.10 GSH o glutatona es un tripéptido compuesto de glutamato, cisteína y glicina que sirve como cofactor para algunas reacciones enzimáticas y ayuda en la reconfiguración de los enlaces disulfuro de las proteínas.

solubles en agua. Además está implicado en el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares (ciclo del γ -glutamil).

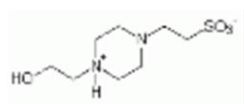
3.1.7 Otros materiales

En la preparación de todas las disoluciones empleadas y en todos los procesos de lavado, centrifugado y diluciones se ha empleado agua de calidad mili-Q (modelo RG, Millipore), con una resistividad superior a 18 M Ω ·cm y un contenido orgánico total (TOC) inferior a 10 ppb.

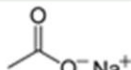
Para controlar la fuerza iónica en las disoluciones preparadas se ha utilizado cloruro sódico (NaCl), adquirido en Laboratorios Merck con un 99.5% de pureza.

Tabla 3.7 Otros materiales utilizados en los experimentos:

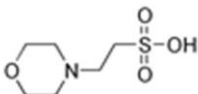
Fórmula molecular	Nombre largo	Casa comercial	M (g·mol ⁻¹)	Pureza (%)
CH ₃ Cl	Cloroformo	Sigma-Aldrich	119.38	≥ 99.5
HF	Ácido fluorhídrico	Sigma-Aldrich	20.01	48
HCl	Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich	36.46	≥ 32
NaOH	Hidróxido sódico	Sigma-Aldrich	40.0	≥ 97
HClO ₄	Ácido perclórico	Sigma-Aldrich	100.46	≥ 70
KOH	Hidróxido potásico	Sigma-Aldrich	56.11	≥ 85
(NH ₄) ₈ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	Molibdato amónico	Sigma-Aldrich	1235.86	≥ 99
C ₆ H ₈ O ₆	Ácido L-ascórbico	Sigma-Aldrich	176.1	≥ 99
(HS-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻ Na ⁺	3-mercaptopropanosulfonato sódico	Sigma-Aldrich	178.21	≥ 90
C ₂ H ₆ OH	Etanol Absoluto	Quimivita	46.07	100
C ₇ H ₈	Tolueno	Sigma-Aldrich	92.14	≥ 99.9
C ₃ H ₆ O	Acetona pura	Quimivita	58.08	≥ 99.9



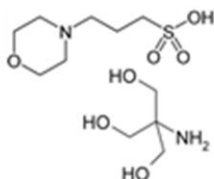
HEPES buffer: $M_w = 238.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$;
 Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
 ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$). $\text{pK}_a = 7.55$



NaOAc buffer: Acetato de sodio. (CH_3COONa), $\text{pK}_a = 4$



MES buffer: Ácido 2-(*N*-morfolino)etano sulfónico
 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$). $M_w = 195.2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. $\text{pK}_a = 6.15$



MOPS: Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
 ($\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$). $M_w = 209.2633 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. $\text{pK}_a = 7.20$

TRIS, tris(hidroximetil)aminometano $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$.
 $M_w = 121.14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
 pK_a of 8.06 at 25°C , rango válido de pH entre 7.1 y 9.0.

PBS: Buffer de fosfato salina que contiene 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM de fosfato de sodio dibásico, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 2 mM de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y válido a un pH igual a 7.4.

Figura 3.11 Disoluciones tampón utilizadas durante la tesis.

En la Figura 3.11 se muestran las principales características de los tampones utilizados durante toda la tesis.

En los experimentos de neutrones se empleó agua deuterada, D_2O (pureza 99%, Sigma-Aldrich), con el objetivo de variar las condiciones de contraste.

Se utilizaron partículas de sílice aminadas (5% w) de 300 nm y de 3 μm (MicroParticles GmbH) y partículas de látex de poliestireno de 20 nm de diámetro y con un potencial zeta medido igual a $-50 \pm 5 \text{ mV}$.

La limpieza y/u oxidación de todos los sustratos se realizó mediante su exposición a disolución *Piraña* preparada in-situ con una relación aproximada 70:30 de H_2SO_4 concentrado (Sigma Aldrich, pureza 98%) y H_2O_2 (Sigma Aldrich, 30% en agua).

Finalmente, en la Tabla 3.7 se presentan otros compuestos utilizados en este trabajo.

Tabla 3.8 Características de los tampones utilizados

Fórmula molecular	Acrónimo	Casa comercial	M (g·mol ⁻¹)	Pureza (%)
C₈H₁₈N₂O₄S	HEPES	Sigma-Aldrich	238.3	≥ 99.5
CH₃COONa	NaOAc	Sigma-Aldrich	82.03	≥ 99
C₆H₁₃NO₄S	MES	Sigma-Aldrich	195.2	≥ 99.5
C₇H₁₅NO₄S	MOPS	Sigma-Aldrich	209.26	≥ 99.5
C₄H₁₁NO₃	TRIS	Sigma-Aldrich	121.14	≥ 99.9
KCl + Na₂HPO₄·H₂O + KH₂PO₄	PBS	Sigma-Aldrich	239.27	≥ 99.9

3.1.8 Disoluciones tampón

Los estudios de las disoluciones han sido realizados en disoluciones tampón, con el objeto de poder estudiar las condiciones fisiológicas, como es el caso de HEPES, PBS o TRIS. Las concentraciones de las disoluciones tampón han sido de 10 mM y 150 mM de NaCl, por ser la concentración fisiológica de sal. Los componentes usados en los distintos tampones se muestran en la Figura 3.11 y sus características se resumen en la Tabla 3.8.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Preparación de los liposomas por extrusión

Las características del lípido pueden variar dependiendo de su composición (catiónico, aniónico, neutro). Sin embargo, podemos utilizar el mismo método de la preparación para todas las vesículas de lípido sin importar su composición. Los elementos generales del procedimiento, que desarrollaremos posteriormente se muestran en la Figura 3.12, e implican la



Figura 3.12 Esquema de la formación de vesículas paso por paso: preparación de la disolución, formación de la película, hidratación y extrusión.

preparación del lípido en forma de película, la hidratación con la agitación, y la extrusión para tener un tamaño de partícula homogéneo.

En nuestro caso el liposoma formado es una mezcla de DODAB y DOPC, en la que hemos ido variando la concentración relativa de cada uno con el fin de observar si existe algún cambio en la formación y propiedades de las vesículas. Tanto el lípido DODAB como el DOPC se deben disolver previamente en cloroformo para posteriormente realizar la mezcla de los dos lípidos.

El cálculo para cada porcentaje se hizo de la misma forma, la cual se explica a continuación tomando como ejemplo el caso de 40% de DODAB, 60% de DOPC.

Lo primero que se necesita saber es el peso molecular promedio que presenta nuestra disolución, que viene dada por la suma de los productos del peso molecular por el porcentaje en el que se encuentra:

$$Pm_{medio} = Pm_{DODA} \cdot \%_{DODA} + Pm_{DOPC} \cdot \%_{DOPC} \quad (3.1)$$

Con la mezcla de estos dos volúmenes en la disolución, podemos obtener la disolución de los dos lípidos en la proporción que se está buscando. Así se ha trabajado en la optimización del sistema DOPC:DODAB de tal forma que se ha estudiado desde un 5% de DOPC hasta un 100% de DOPC en diferentes tamaños, principalmente 100 nm, pero también de 1 μ m.

Además de los liposomas de carácter catiónico, han sido estudiados otros liposomas con relación molar fijada 1:1 y con una concentración de $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$:

- Insaturado, zwitteriónico, DOPC:NBD_PC.
- Insaturado, con carga negativa: DOPC:DOPS:NBD_PC.

- Saturado, zwitteriónico: DMPCDPPC:DPPS:NBD_PC.
- Saturado, de carga negativa: DMPC:DPPC:NBD_PC.

1. Preparación del lípido en forma de película.

Para poder formar la película se necesita eliminar el disolvente, de tal forma que para volúmenes pequeños de disolvente orgánico (<1 ml), podemos evaporarlo con una corriente seca de nitrógeno o argón en un vial; sin embargo, para volúmenes más grandes, el disolvente orgánico se debe quitar con el rotavapor. En nuestro caso al tener un volumen de alrededor de unos 200 μ l, usaremos una corriente de nitrógeno. En el caso de no utilizar inmediatamente la película formada, se congela hasta el momento en el que vaya a ser hidratada.

2. Hidratación de la película

La hidratación de la película se logra añadiendo un líquido y agitando. La temperatura del medio de hidratación debe ser cercana a la temperatura de transición cristalina del gel-líquido (T_c o T_M). Después de la adición del líquido, la suspensión formada se debe mantener a esa temperatura durante un periodo de tiempo de hidratación. Este tiempo puede ser levemente distinto en función de la especie y estructura del lípido; sin embargo se recomienda en general un tiempo aproximado de una hora con una fuerte agitación.

Los medios de hidratación más utilizados son el agua destilada, las disoluciones salinas, y los tampones. En este trabajo se ha utilizado una disolución de cloruro sódico 10 mM para producir la hidratación y formar las vesículas. A cada muestra le hemos añadido el mismo volumen de disolución de NaCl, de tal forma que la fuerza iónica permanecerá constante en todas las muestras.

3. Extrusión de la disolución de vesículas

La extrusión del lípido es una técnica mediante la cual una suspensión del lípido es forzada a pasar a través de un filtro de polycarbonato, con un tamaño de poro bien definido, en un número de veces superior a once. Este procedimiento da lugar a partículas que tienen un diámetro igual al tamaño del poro del filtro usado.

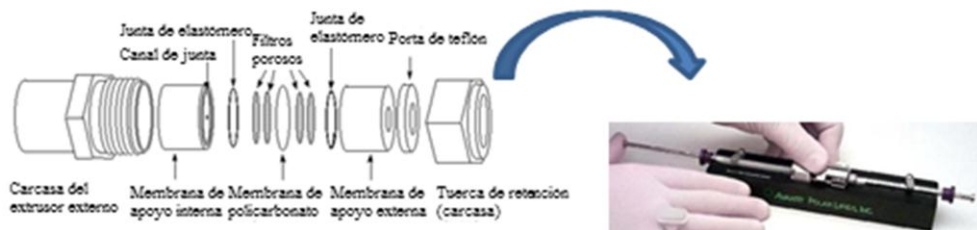


Figura 3.13 Partes de un mini-extrusor y detalle del ensamblaje de cada una de ellas. Una vez ensambladas se coloca la pieza en el interior del estabilizador de temperatura donde van perfectamente sujetas las dos jeringuillas en cada uno de los extremos. Esto permitirá tener una temperatura constante durante todo el proceso de extrusión.

El motivo de llevar a cabo este procedimiento para formar las vesículas es que éstas no estén en equilibrio con ninguna otra especie en la disolución, de tal manera que, cuando se produzca el recubrimiento, se tenga la certeza de que únicamente se están recubriendo las vesículas. Además se consigue que el tamaño de las vesículas sea homogéneo.

El Mini-extrusor de Avanti Polar lipids (Figura 3.13) permite preparar vesículas unilamelares por extrusión de una forma eficiente y rápida. En el caso en que se necesite producir vesículas de fosfolípidos con una temperatura de transición de fase (T_M) por encima de la temperatura ambiente se utilizará una manta calefactora que homogeniza la temperatura del mini-extrusor y la mantiene constante durante todo el proceso. Construido de acero inoxidable y de teflón, permite una limpieza rápida de todas las partes, lo que reduce el tiempo perdido entre la producción de vesículas de diferentes especies de lípidos.

En este método, los fosfolípidos son suspendidos inicialmente en una solución salina tamponada a dar vesículas multilamelares. La disolución con vesículas pasará repetidas veces a través de un filtro de polycarbonato de 100 nm de diámetro de poro. El resultado son vesículas unilamelares de un tamaño uniforme. Se utilizan unas jeringas que permiten preparar 1 ml de fosfolípidos cada vez. En las primeras pasadas a través de una membrana, la distribución de tamaño de partícula tiende hacia una distribución bimodal. Después de suficientes pasos a través de la membrana, se obtiene una distribución normal unimodal. En este trabajo, la extrusión con este equipo se ha realizado con 15 pasos a través de la membrana. Es esencial un

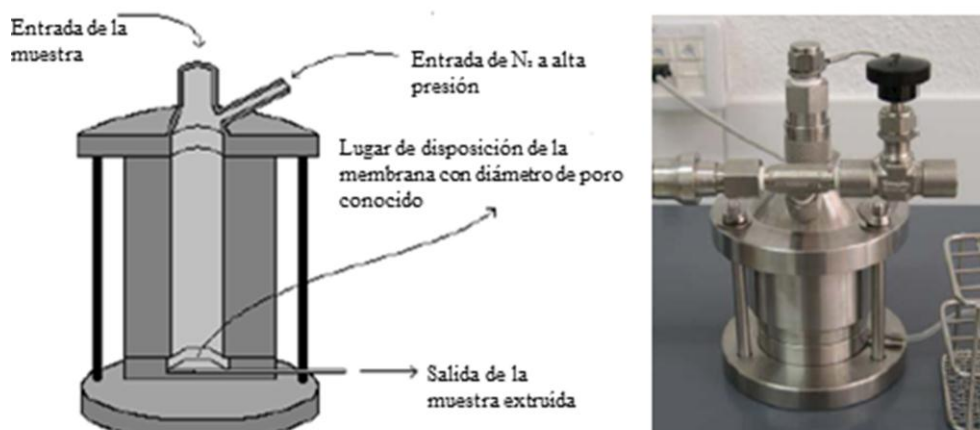


Figura 3.14 Extrusor tipo thermo barrel extruder de Northern Lipids con capacidad de 10 ml de muestra.

número impar de veces para que el producto acabe en la jeringa vacía inicialmente, y así evitar que las vesículas multilameras contaminen el producto final. El producto final se almacena a 4°C.

La Figura 3.14 muestra el extrusor con mayor capacidad. La forma de colocar la membrana sigue el mismo proceso descrito para el mini-extrusor pero en este caso el diámetro de la membrana y de los filtros es mayor. La presión de trabajo óptima es 14-21 bar, aunque si fuera insuficiente, se puede aumentar hasta un máximo de 55 bar. El tanque de reserva de nitrógeno debe tener al menos 10 bar de reserva antes de comenzar con el proceso de extrusión. En este extrusor se recomienda que la disolución atraviese la membrana al menos 30 veces con una velocidad constante para que la homogeneidad esté asegurada.

3.2.2 Determinación de la concentración de fósforo

El problema que presenta la preparación de vesículas es que es difícil saber qué concentración de lípido se tiene tras el proceso de extrusión. Un método que nos permite conocer esta concentración es valorar el fósforo que hay en la disolución, de forma que se puede relacionar la concentración de fósforo con la concentración de lípido en los liposomas formados.

Existen varios métodos para cuantificar la concentración de liposomas. El primer método conocido es el desarrollado por Bartlett^[331], ampliamente utilizado cuando la disolución (en la que se encuentra inmerso el fosfolípido) no contiene fosfatos. Entre los métodos espectrofotométricos más versátiles cabe destacar el método de Rouser desarrollado en 1970^[332] y modificado posteriormente por diferentes autores como Stewart^[333], ampliamente utilizados para concentraciones pequeñas de fósforo y todo tipo de disoluciones tampón. Estos métodos se basan en la determinación colorimétrica del fosfato inorgánico. El fosfolípido contenido en los liposomas puede ser determinado tras convertirlo en fosfato inorgánico al añadir a la muestra ácido perclórico. Una vez convertido el fosfolípido se forma un complejo con molibdato, que permitirá la determinación colorimétrica del fósforo presente en la muestra. El método de Rouser se va a explicar con todo detalle a continuación dado que es el que ha sido utilizado en este trabajo.

1. Valoración del Fósforo

Para valorar el fósforo es preciso disponer de una recta de calibrado. Se prepara una disolución a $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de KH_2PO_4 , y se diluye 1:20, es decir, hasta $0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Para ello se toma $100 \mu\text{l}$ de la disolución madre y se añade 1.9 ml de agua.

Preparada esta disolución, se toman, por duplicado, distintos volúmenes de KH_2PO_4 para preparar las disoluciones indicadas en la Tabla 3.9, midiéndose los valores de absorbancia, A , y representando A frente a la concentración.

La muestra de las vesículas se pone por duplicado en un volumen de 100-200 μL , y se dejan secar a 80°C hasta evaporar el líquido completamente.

Una vez evaporado todo el líquido, a cada tubo se le añade 450 μL de HClO_4 , y se incuba en un baño de arena atemperado a $250\text{-}260^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos, con los viales tapados con las ampollas de vidrio, con el fin de que se produzca la mineralización del fósforo. Es importante subrayar que es una temperatura de la que no puede pasar para que las posteriores reacciones se realicen de la forma correcta y así conseguir una medida exacta de la concentración de fósforo.

Transcurrido este tiempo, a las muestras se les añaden 3.5 mL de agua miliQ, 500 μL de molibdato amónico 2.5% p/v y 500 μL de ácido ascórbico (para reducir el complejo). Se agita rápidamente con el vórtex, para evitar desfase entre unas muestras y otras, y se incuba en un baño de agua a 100°C durante 7 minutos, tiempo en el que se produce la reducción completa del fósforo, lo que viene indicado por un cambio de la coloración (pasa a azul). Después de este tiempo se enfría con hielo y se mide la absorbancia del fósforo a una longitud de onda de 820 nm.

3.2.3 Síntesis de microgeles

Hemos estudiado un microgel con carga positiva, formado por poli(N-

Tabla 3.9 Volúmenes para la preparación de la recta patrón

Vial	Volumen KH_2PO_4 ($0.05\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) $\cdot\mu\text{L}^{-1}$	n fosfato $\cdot\mu\text{moles}^{-1}$
0	0	0
1	4	0.0015
2	6	0.00225
3	10	0.0037
4	40	0.015
5	70	0.026
6	100	0.037
7	250	0.092
8	400	0.147

isopropilacrilamida) p-(NIPAM), sensible a la temperatura y que contiene 1-vinilimidazol (VI) y rodamina, un fluoróforo que permite obtener espectros de fluorescencia. Aquí, el monómero principal, NIPAM, presta termosensibilidad al sistema, mientras que el co-monómero, vinilimidazol, permite controlar el pH. Por lo tanto, los microgeles, a diferencia de sustratos convencionales, duros y rígidos, ofrecen una amplia gama de plantillas cuyo diseño arquitectónico es en sí mismo un parámetro a considerar. En este sentido la adicción del surfactante conduce a la formación de microgeles más pequeños y asegura su reproducibilidad. El método de síntesis elegido permite obtener microgeles cargados, en los que la carga se sitúa en el exterior y el interior permanece neutro, es denominado *core-shell* y se detalla a continuación.

El microgel p-(NIPAM)-co-VI fue sintetizado por polimerización precipitación radical (Ver Figura 3.15). La polimerización se llevó a cabo en un frasco de 2 L de fondo redondo equipado con un agitador mecánico, condensador de reflujo, termómetro, y la entrada del gas. 15.000 g de NIPAM, 0.398 g del entrecruzador BIS, 0.163 g del surfactante CTAB y 0.738 g del co-monómero VI fueron disueltos en 1 L de agua purgados con nitrógeno durante al menos 1 h.

La polimerización se inició con 0.453 g V50 y se llevó a cabo durante 6 h

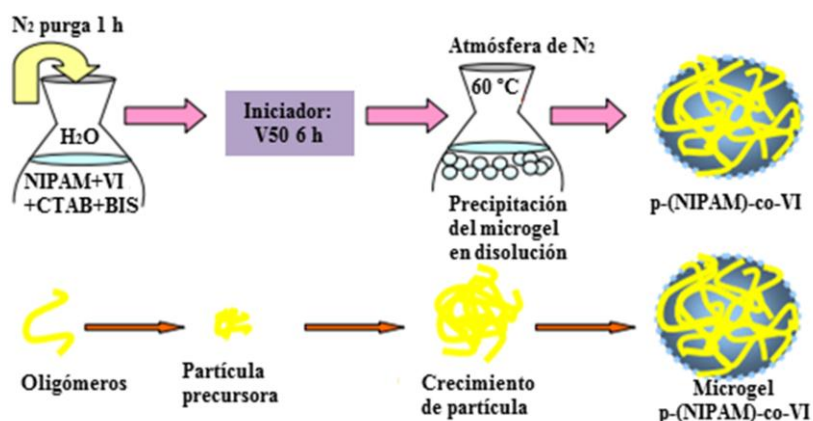


Figura 3.15 Síntesis del microgel p-(NIPAM)-co-VI que comienza con la mezcla de oligómeros para dar lugar a la partícula precursora y posteriormente el crecimiento que da lugar al microgel^[21].

a 60°C bajo una corriente de nitrógeno y agitación constante a 400 r.p.m. La dispersión se pasa a través de lana de vidrio con el fin de eliminar las partículas y purificar más de cinco ciclos de centrifugación a 50000 r.p.m. y 25°C.

El microgel se estudió en una disolución acuosa, los polielectrolitos fueron disueltos en sal haciendo un estudio de diferentes fuerzas iónicas. Sin embargo, se hizo un pequeño estudio tanto para microgeles en agua como en una disolución salina: 0.1, 0.25 M de NaCl.

3.2.4 Síntesis del polímero funcionalizado con grupos -SH.

En un vial de fondo redondo se mezcla PDA-HCl con una disolución de EDC de 20 g·l⁻¹ en DPBS a pH7 y una vez todo esté mezclado se añade PMA en función del grupo de tioles que se quiera crear, como se observa en la Figura 3.16. En este caso, el grupo de tioles es del orden de 12-14%. Todo se mezcla con ayuda de un vórtex durante al menos 2 minutos y se deja toda la noche en agitación.

De la Figura 3.16 se deduce que la formación de este polímero es debido a dos pasos, el primero a la reacción de PMA con PDA en presencia de EDC, y una segunda parte para activar las terminaciones en grupos tioles con ayuda de DTT.

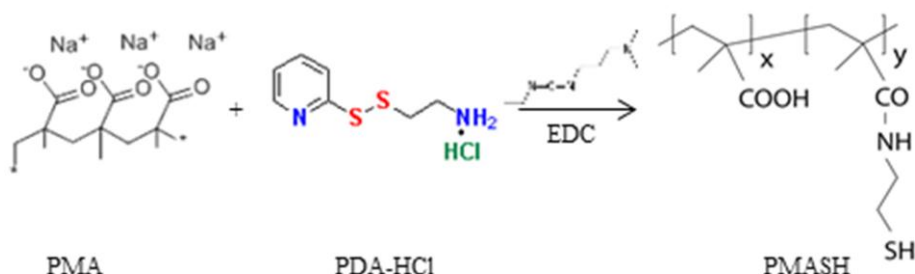


Figura 3.16 Formación de PMA con grupos tioles. Con la ayuda del EDC se activa el grupo -NH₂ para rápidamente formará un enlace con el grupo carboxílico del PMA obteniendo una molécula con el número de grupos tioles deseados.

En el primer paso se realiza una diálisis de al menos 24 horas para purificar el polímero formado por PMA-PDA utilizando una membrana para diálisis con una longitud de 20-25 cm (12 KDa de peso molecular). Tras la diálisis, todo el polímero que ha reaccionado será atrapado en el interior y los restos de monómeros no reaccionados difunden hacia fuera. Y en este momento se evapora el líquido en el que se encuentra inmerso el polímero para ser almacenado finalmente en el frigorífico.

En el segundo paso, se activan los grupos tioles del polímero añadiendo DTT en MOPS (pH 8) a 37°C durante 15 minutos.

3.2.5 Síntesis de nanocápsulas poliméricas

Para formar la capsula polimérica se depositan los polímeros que interactúan entre sí mediante enlaces de hidrógeno, poli (N-vinil pirrolidona) (PVP) y ácido poli (metacrílico) modificado con grupos tioles (PMA_{SH}). Las partículas de sílice ($\phi=3\text{ }\mu\text{m}$) se recubrieron con un total de diez capas.

La adsorción de las distintas capas se llevó a cabo mediante incubación de las partículas con el polímero, sea PVP o PMA_{SH} a pH 4 durante 15 minutos y con agitación continua. Una vez incubadas, la mezcla se centrifuga tres veces, lavando el sólido depositado en las paredes del vial con disolución tampón a pH 4, así hasta conseguir cinco bicapas de polímeros alternados PVP/PMA_{SH}. Una vez recubierta la partícula, los enlaces de hidrógeno creados por el PMA_{SH} se convierten en enlaces disulfuro al añadir CAT, un entrecruzador biodegradable. Este proceso se realiza añadiendo una disolución de CAT 2 mM en ácido 2 - (N-morfolino)-etano, MES, (tampón preparado con una concentración de 50 mM y pH 6) sobre la disolución de partículas recubiertas durante un minuto. Inmediatamente se centrifuga y se deja a pH 4 (20 mM de NaOAc).

Al acabar el recubrimiento de las partículas de 300 nm se añadió una sonda fluorescente, AF_{mal}-633 que permitió observarlas con el microscopio y caracterizarlas con citometría de flujo.

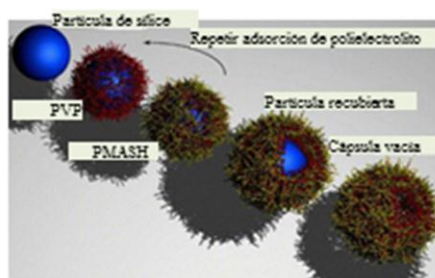


Figura 3.17 Formación de las cápsulas poliméricas vía la técnica LbL por interacciones electrostáticas. Una vez disuelta la particular tras formar las capas, se obtiene una cápsula con coraza semipermeable que puede albergar diferentes sustancias.

Tras el recubrimiento, las partículas de sílice se disolvieron mediante tratamiento con una disolución acuosa de ácido fluorhídrico HF 5 M durante 5 minutos. Una vez se ponen en contacto con la disolución ácida se centrifugan y se deja la disolución a pH 4 (acetato de sodio, 20 mM). En este momento, se eliminan las partículas dando lugar a una cápsula polimérica formada por los polímeros unidos por puentes di-sulfuro estable a $4 \leq \text{pH} \leq 7$ (evitando la hidrólisis ácida o básica). Este proceso se muestra en la Figura 3.17.

3.2.6 Técnica capa a capa sobre sustratos esféricos

Liposomas

La aplicación de esta técnica sobre los liposomas requiere modificaciones respecto a lo explicado anteriormente. Cuando se añade a la solución de liposomas un volumen de concentración conocida de disolución de polielectrolito de la misma concentración salina y se agita la mezcla con ayuda de un vórtex durante al menos cinco minutos se produce la primera capa de polielectrolito sobre los liposomas; en la disolución se encuentran liposomas recubiertos, no recubiertos y polielectrolito libre debido al exceso añadido, pero aun así el resto de agregados presentes en la disolución no afectan a las medidas de dispersión de los liposomas recubiertos. El mayor problema viene con la segunda capa con la que se van a producir agregados

no deseados que son los complejos inter-poliectrolito, los cuales interfieren en las medidas obtenidas y por ello deben ser eliminados. Un proceso puesto a punto en este trabajo ha sido la centrifugación de las mezclas de forma que los complejos de polielectrolito quedan depositados en las paredes del vial, clarificándose así la disolución. Si bien es cierto que con la centrifugación también se pierden liposomas que hayan sido arrastrados por el complejo inter-poliectrolito pero el porcentaje es tan pequeño que fue el método elegido para obtener nuestros sistemas.

Así, una vez realizada la mezcla formada por los liposomas y el segundo polielectrolito, tras ser depositado el primero, ésta se centrifuga tres veces para eliminar el exceso de complejo de polielectrolito. La Figura 3.18 muestra el proceso del recubrimiento. El equipo de potencial zeta confirma la inversión de carga y el equipo de dispersión de luz confirma el tamaño. Bien es cierto que a medida que aumentas las capas de polielectrolito, más pérdidas de liposomas se producen debido a las numerosas centrifugaciones.

Por esta razón, en los sistemas estudiados, se puede asegurar las mínimas pérdidas de liposomas para un número total de ocho capas. El objetivo en este trabajo ha sido conseguir el mayor número posible de capas de polielectrolitos de carga opuesta añadidas sobre el lípido, pero a su vez intentando mantener la máxima estabilidad posible del sistema. Esto se ha realizado con diferentes polielectrolitos por dos vías. Una vía comienza con una primera capa de PLL, PSS, PEI seguida de otra de PGA, PAH, PDADMAC o PLL repitiendo el proceso varias veces; mientras que la otra opción es empezar con una capa de PEI seguida de otra de PGA, y continuar añadiendo capas de PLL y PGA. Se ha comprobado cuál de las dos vías es más eficaz y proporciona mayor estabilidad mediante medidas de tamaño y de potencial zeta. Cabe destacar que es necesario un tiempo adecuado en cada deposición para que la adsorción se complete antes de realizar las correspondientes medidas de potencial y/o tamaño.

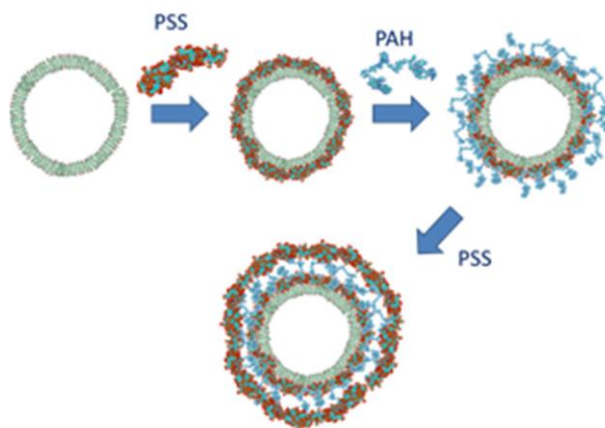


Figura 3.18 Recubrimiento de liposomas con una primera capa de polielectrolito PSS y una segunda de PAH.

A medida que se van adsorbiendo más capas, la posibilidad de que se formen agregados de partículas debido a excesos de polielectrolitos no adsorbidos, es mayor. Es por ello muy importante centrifugar la muestra cada vez que se añade una nueva capa de polielectrolito para eliminar dicho exceso, que falsearía las medidas realizadas. Este paso se realiza en una centrífuga durante 30 minutos aproximadamente, a 6000 r.p.m.

Microgeles

Un volumen de la dispersión acuosa de microgel fue añadido a un mayor volumen de una solución acuosa de $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de polielectrolito, con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.10, 0.25M). La relación de volumen fue 1:4. Los polielectrolitos estudiadas fueron: PSS, y PDADMAC, ambos con densidad de carga independientes del pH.

Por otra parte, se utiliza poli-L-Lisina marcado con fluoresceína (FITC), disuelto en 0.1 M de NaCl, que dará lugar a una capa de carga positiva entre el sistema PSS-PDADMAC. El otro par de polielectrolitos utilizado fue PLL y PGA, que se disolvieron en una solución tampón para mantener un pH constante de 7.4 durante la formación de las capas. La disolución tampón se preparó con: MES y TRIS en disolución salina 0.15 M de NaCl. El pH se regula mediante la adición de KOH.

En el microgel con carga negativa, la primera capa depositada es siempre positiva. La mezcla se mantuvo en agitación constante durante toda la noche. Los polielectrolitos en exceso se eliminan con tres ciclos de ultracentrifugación a 50000 rpm durante 30 minutos. Entre cada centrifugación, se ha eliminado cualquier resto de líquido, y el sólido se volvió a dispersar de nuevo en agua desionizada. Esta secuencia se repite hasta que se alcanza el número de capas deseado. Antes de cualquier caracterización, la microgeles con distinto número de capas se dejaron toda la noche y las soluciones se filtraron a través de un micrón 1,20 micras con un filtro de Minisart.

El aumento de las capas provoca un aumento en el radio hidrodinámico (R_H), influenciado por la naturaleza del polielectrolito utilizado en la capa.

Sistemas Híbridos

Estos sistemas se desarrollan en Australia, en el grupo de Caruso y col., tras los numerosos estudios realizados con capsosomas^[217]. Se ha intentado conseguir nuevos sistemas de encapsulación de fármacos más versátiles que contengan partículas poliméricas y liposomas (de ahí el nombre de híbridos). En la Figura 1.20 se puede observar el híbrido después de haber sido eliminada la partícula de sílice.

La capa precursora es un polielectrolito funcionalizado con colesterol, sea PLLc o PMAc, dependiendo del sistema estudiado con el objeto de mantener más eficazmente anclados los liposomas. Los polielectrolitos que sirven como capas de separación serán PMA, PLL y PMAc en función del tipo de fosfolípido que forma parte del liposoma. La formación de estos sistemas se realiza mediante la técnica LbL y al mismo tiempo, para reforzar las uniones se utiliza el entrecruzamiento de las capas exteriores dando lugar a un sistema cuya parte externa no es biodegradable, si bien contiene nanosistemas que sí lo son. El proceso se va a explicar con más detalle:

Una suspensión de partículas de sílice (5%w) lavada tres veces con HEPES (10 mM HEPES, 150 mM de NaCl, pH 7.4) fue utilizada como la base de estas estructuras. Se comenzó con la adsorción por interacciones electrostáticas de nanocápsulas de 300 nm, (a pH 5 con tampón MES 100 mM) previamente sintetizadas, durante 10 minutos de constante agitación y a pH 5. Pasados 10 minutos, la muestra se lava tres veces con tampón HEPES a pH 7. En este momento se añade PMA cuya concentración final en la disolución es de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mezcla que se incubó durante 10 minutos.

Se lava de nuevo tres veces con HEPES y se añade la capa de polímero precursora, (PMA_c o PLL) de concentración 1g L⁻¹ incubándose durante 15 minutos con un lavado posterior a 1000 rcf durante 30 segundos.

Los liposomas entonces son añadidos con una concentración de 1g·L⁻¹ y la muestra se mantiene agitando durante 40-60 minutos para permitir que las partículas recubiertas con polímero interaccionen con los liposomas. Se para la agitación y se centrifuga tres veces. La denominada capa de protección, de anclaje o *capping layer* más conveniente encontrada es la formada por PMA_c, que evita la desorción del liposoma ya que el colesterol se introduce en la bicapa del liposoma haciendo más fuerte la unión. En este momento la muestra se centrifuga al menos una vez con disolución tampón a pH 4, con NaOAc (20 mM) para cambiar el pH de la disolución.

Es en este momento en el que se forman hasta 10 capas para proteger los liposomas. Los polímeros son PVP y PMASH a pH 4. La concentración de los polímeros adsorbidos es de 1g·L⁻¹, cada adsorción se realizó durante 10 minutos en constante agitación y se centrifugó tres veces con pH 4 cada una de las capas.

Una vez formado el sistema, se busca que se forme un ensamblaje más resistente. Para ello, se añade el entrecruzador a la muestra, en este caso es Bis-maleimida-poli-etilenglicol, BM(PEG)₂, con una concentración de 2 mM durante 15 horas tamponado con MES (50 mM, pH 6). Este óxido de poli-etileno bifuncional con maleimida va a provocar la formación de enlaces disulfuro muy estables entre los grupos tioles presentes en el polímero modificado.

Finalmente, la muestra se centrifuga (1 minuto a 1000 rcf) y tras un primer lavado con la misma disolución tampón en la que se encuentra el híbrido, se realizan dos lavados más para dejarlos en disolución tamponada de NaOAc 20 mM a pH 4.

Para formar la cápsula polimérica se hizo un tratamiento con ácido fluorhídrico (HF) menos agresivo que el utilizado para las partículas pequeñas por ser un sistema más complejo: Una mezcla de HF 5 M y NH₃HF (3:4) se puso en contacto con la muestra durante 2 minutos y rápidamente se centrifugó, lavando la muestra con disolución tampón a pH 4 al menos tres veces. Parte de la muestra se deja a pH 4 y otra parte se puede centrifugar otra vez para cambiar la disolución tampón y mantener la muestra a pH 7.

Una variedad ya nombrada pero no explicada hasta ahora, y que también se investigó, fueron los híbridos invertidos, que se desarrollaron de la misma forma que los híbridos pero ensamblando primero los liposomas para conseguir liposomas flotando en la cápsula cuando se cambia el pH. Estos híbridos invertidos, cuyo proceso de formación se muestra en la Figura 3.19, pretenden simular los capsosomas pero más complejos, de forma, que al cambiar el pH, los liposomas y las cápsulas poliméricas quedan flotando en el interior de la gran cápsula polimérica, permitiendo así reacciones en cascada^[334].

3.2.7 Funcionalización de los liposomas. Ensayo cuantitativo

Reacción enzimática

La elección de la enzima β -lactamasa como modelo de enzima permite

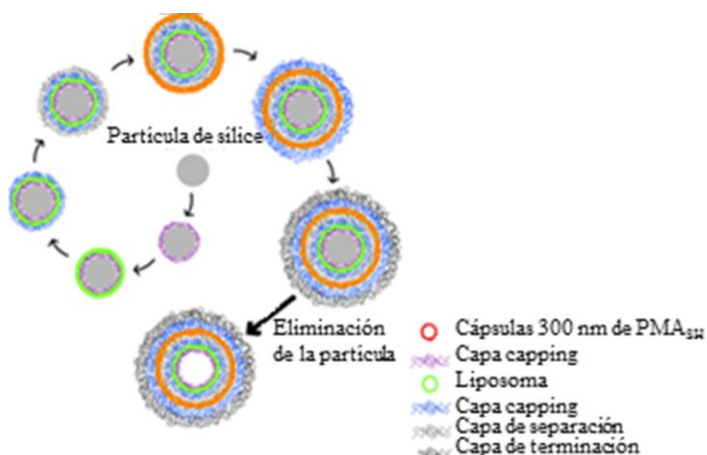


Figura 3.19 Esquema que muestra el proceso de ensamblaje para híbridos invertidos. De esta forma, sobre la partícula de sílice se añade la capa precursora de PMA_c seguido de la deposición de los liposomas y la siguiente adsorción secuencial de capas separadoras PMA_c y PLL. A continuación se añaden las cápsulas de 300 nm y se finaliza con el ensamblaje electrostático de los polímeros PVP/PMA_{SH}. Con un tratamiento de HF se consigue vaciar la partícula de sílice.

visualizar y cuantificar su actividad controlando la conversión de nitrocefina (amarillo) en producto hidrolizado (rojo) mediante un ensayo colorimétrico, según se puede observar en la Figura 3.20. Para confirmar la presencia, la encapsulación y la actividad de la enzima en el interior del liposoma, se añadió TRITON X-100 (T X-100) como tensioactivo usado para liberar las moléculas de la enzima del liposoma y así hacerlas accesibles a la nitrocefina.

Es importante conocer la reacción que tienen lugar entre la nitrocefina y por tanto poder entender lo que ocurre cuando se encuentra en disolución. De forma general la nitrocefina se encuentra en forma de polvo que es soluble en agua y adquiere un color amarillo más o menos intenso en función de su concentración. El cambio de color al entrar en contacto con la enzima se atribuye a la conjugación del sustituyente dinitroestireno con el anillo β -lactámico y el doble enlace en el anillo dihidrotiazina, lo cual se puede observar a 386nm^[113, 335, 336]. Al ser rápidamente hidrolizado por la enzima, la absorción a 386nm disminuye para aparecer en una longitud de onda mayor, tal como puede observarse en la Figura 3.22.

El ensayo consiste en añadir 5 μ L de nitrocefina en 45 μ L de tampón PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH fisiológico, 7.4 y de concentración 0.1 M) a la muestra de híbridos. Se realiza en dos tubos, uno que sirve de control y el otro donde se produce la reacción enzimática. En uno de ellos, los liposomas contienen la enzima confinada en el interior. A ambos tubos se añade el tensioactivo y se deja reaccionar durante 3 horas. El resultado será que en uno de ellos el color se torna a rojo, debido a que la enzima liberada por acción del tensioactivo reacciona con la nitrocefina, hidrolizándola y

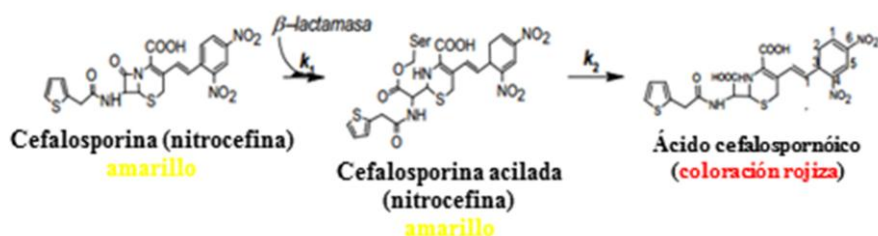


Figura 3.20 Transformación estructural sufrida en la nitrocefina al ponerse en contacto con la enzima en disolución acuosa.

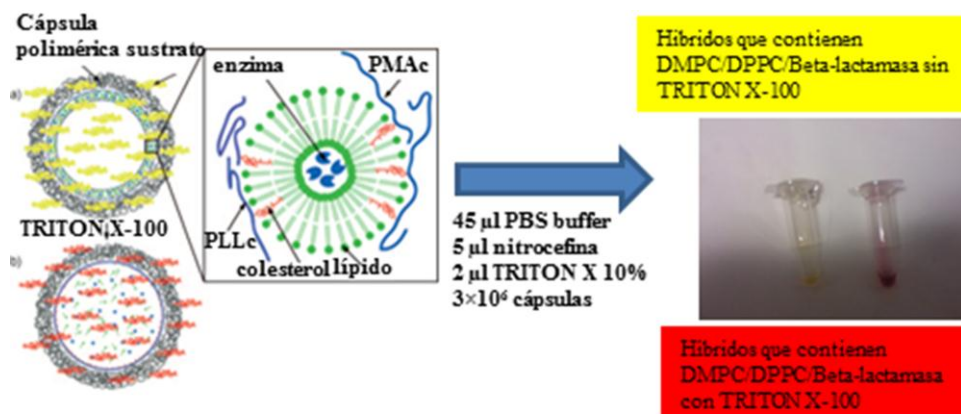


Figura 3.22 Ensayo enzimático que consiste en la liberación del fármaco que con el contacto del sustrato se produce el cambio de color de amarillo a rojo confirmando la encapsulación del fármaco en el interior de los liposomas.

volviéndola de color rojo. En el otro tubo como no existe enzima, el color se mantiene amarillo, ya que a pesar de añadir el tensioactivo y romper los liposomas no libera nada ya que no se ha encapsulado nada.

Degradación de capsulas poliméricas.

Una ventaja significativa de los híbridos o de los híbridos invertidos es la posibilidad de encapsular diferentes tipos de fármacos y poseer diferentes tipos de respuestas según el estímulo aplicado. Para ilustrar esta posibilidad, se ha utilizado el entrecruzador no degradable para entrecruzar las capas del híbrido y que no pueda ser afectado por ningún estímulo.

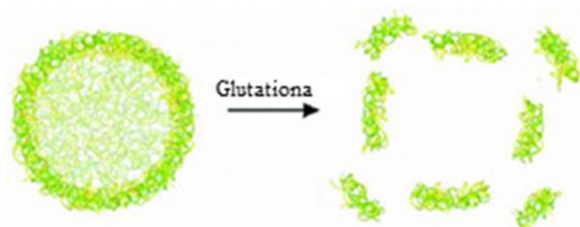


Figura 3.21 Reacción de GSH con capsula poliméricas de PMA_{SH}/PVP.

El agente reductor, utilizado para ello, es la glutatona, GSH y DTT para previos experimentos, confirmando así su degradación. Es posible degradarlos por haber utilizado el entrecruzador degradable CAT (agente oxidante que convierte los enlaces de hidrógeno en puentes disulfuro), tal y como muestra la Figura 3.21.

La degradación de las nanocápsulas fue realizada introduciendo en una disolución de GSH 5 mM en PBS a pH 7.4 un volumen de 5 μ L de la disolución que contiene híbridos. La disolución mezcla se calentó hasta 37°C en constante agitación (al menos 1000 rpm). La muestra se mantuvo así toda la noche para asegurar la completa degradación de las cápsulas. La muestra control estaba formada por la disolución de híbridos sin GSH calentada y tratada de la misma forma para observar la diferencia. La degradación fue caracterizada por citometría de flujo y por microscopía.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTUDIO DEL RECUBRIMIENTO DE LIPOSOMAS

4.1.1 Liposomas

En este capítulo se han estudiado suspensiones de liposomas recubiertos. El estudio se ha estructurado en dos etapas. La primera etapa es la caracterización del sistema plantilla, es decir, de las suspensiones de liposomas sobre los que se va a producir el recubrimiento. La segunda etapa es el estudio detallado y la puesta a punto del método de recubrimiento de liposomas.

Como sistema plantilla se han utilizado liposomas formados por diferentes fosfolípidos. Los estudios principales se han centrado en dos tipos: Liposomas catiónicos formados por la mezcla del fosfolípido (DOPC) y el tensioactivo catiónico bicatenario (DODAB), y liposomas de carácter zwitteriónico formados por DOPC y DPPC.

En el caso de liposomas catiónicos (DOPC:DODAB), ha sido necesario realizar un estudio de la variación de la densidad de carga en función de la contenido de DODAB en la mezcla. La densidad de carga determina la cantidad de polielectrolito que se debe añadir a la suspensión para que tenga lugar el recubrimiento del liposoma mediante interacción electrostática liposoma-polielectrolito.

Se han realizado también estudios de liposomas zwitteriónicos puros (DOPC) con objeto de poder ampliar el marco de plantillas disponibles para recubrimientos y formación de estructuras más complejas, tipo coloidosomas.

Se puede definir coloidosoma como aquella estructura formada por la adsorción de nano o micropartículas en la interfase de microgotas formadas en sistemas de líquidos inmiscibles^[337-339]. Hasta ahora, se han desarrollado sistemas formados por sólidos porosos^[340], espumas^[341] o partículas nanocompuestas^[342] para diversas aplicaciones, principalmente en biomedicina^[343-348]. En nuestro caso nos hemos centrado en los coloidosomas formados por partículas de poliestireno cargadas^[349-353] y liposomas cargados que mediante la técnica capa a capa son adsorbidos en la superficie (Figura 4.1).

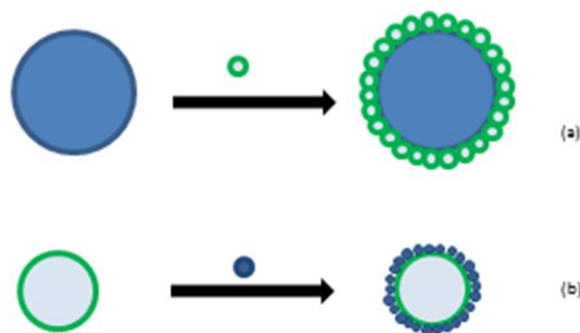


Figura 4.1 Coloidosomas donde (a) representa la adsorción de liposomas unilamelares pequeños sobre la superficie de micropartículas de poliestireno y (b) la adsorción de nanopartículas de poliestireno sobre liposomas unilamelares pequeños.

Determinación de la concentración de fósforo

Para comenzar con este estudio, es importante conocer la concentración del sistema plantilla que se utiliza. Inicialmente se conoce la cantidad de lípido que se introduce para formar la bicapa lipídica. Sin embargo, el problema que presenta la preparación de vesículas es que no se sabe qué cantidad de lípido se pierde en la extrusión, y por lo tanto se desconoce la concentración de liposomas después de la misma. Aplicando el método descrito en el capítulo de **Materiales y métodos** para la determinación de contenido en fósforo, es posible estimar las pérdidas y el contenido lipídico de las vesículas formadas. Para vesículas unilamelares pequeñas formadas por un único lípido se estima una pérdida de alrededor de un 10% en el proceso de extrusión^[354]. La determinación de la concentración^[331, 355] de lípido en los liposomas se ha desarrollado para el sistema de liposomas de carácter catiónico formado por mezclas DOPC:DODAB.

En la Figura 4.2 (a) se ha realizado un ajuste lineal con ordenada en el origen nula para las vesículas formadas después de la extrusión cuya pendiente resultante es $7.52 \cdot 10^{-6} \pm 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. El número de moles de fosfato es igual al número de moles de fósforo y por tanto del fosfolípido que forma parte de la vesícula.

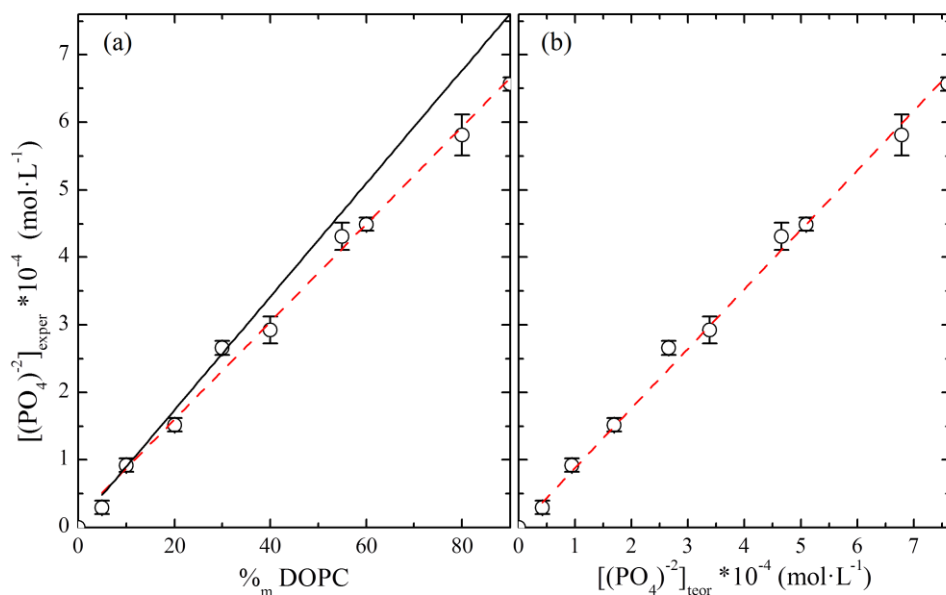


Figura 4.2 (a) Variación del contenido en fósforo con respecto al $\%_m$ de DOPC presente en los sistemas estudiados. Análisis del contenido en fósforo de liposomas de carácter catiónico DOPC:DODAB con un tamaño de 100 nm, obtenidos mediante extrusión en disolución 10 mM de NaCl frente al porcentaje de DOPC en vesículas formadas por mezclas de DOPC:DODAB. La línea continua representa los valores esperados sin pérdidas. (b) Variación de las pérdidas después del proceso de extrusión. La línea discontinua representa el ajuste de los datos.

Dispersión de luz para liposomas formados por DOPC y DODAB

Como se dijo en el capítulo de **Metodología**, para que se de la formación de vesículas, la disolución de la bicapa lipídica hidratada debe pasar a través de una membrana. En la Figura 4.2 (b) se presenta la concentración teórica con respecto a la calculada experimentalmente y la pendiente obtenida es 0.9 (adimensional) y como consecuencia se confirma lo observado en otros sistemas^[354]: la pérdida sufrida en nuestro sistema tras la extrusión asciende a un 10-12%.

En principio a partir del dato de concentración lipídica, junto con datos de densidad de la membrana y radio externo e interno de la misma obtenida

Tabla 4.1 Radio hidrodinámico obtenido al extruir la disolución de vesículas y utilizando una membrana de tamaño de poro de 100 nm.

Número de extrusiones	R_H /nm
3	80.43
4	59.40
6	58.19
7	54.15
8	53.25
9	50.42
10	51.00
11	47.74

mediante las **Técnicas dispersivas** es posible estimar la concentración de vesículas.

En nuestro estudio todos los sistemas de liposomas son obtenidos mediante la técnica de extrusión, con lo que el tamaño de los mismos queda determinado por la membrana elegida a través de la cual se hace pasar la disolución. El tamaño del liposoma más estudiado durante esta tesis ha sido 100 nm de diámetro, pero se ha realizado un pequeño estudio con membranas de tamaño de poro superior para comprobar el efecto en la polidispersidad. La polidispersidad se refleja en el valor numérico del *índice de polidispersidad* (PDI). El valor máximo para el PDI es 1 y, cuanto más se aproxime a cero, más monodispersa es la disolución, y por tanto la distribución es unimodal.

En la tabla Tabla 4.1 se muestra el tamaño obtenido con el equipo de menor volumen, el mini-extrusor, observando que desde la primera extrusión el tamaño se homogeneiza fácilmente, adquiriendo el tamaño deseado tras realizar once extrusiones. Como el volumen obtenido con este equipo es muy pequeño, 1 mL, se comenzó a utilizar uno de mayor volumen, el cual también se optimizó para determinar el mínimo número de extrusiones que son necesarias para obtener siempre el mismo tamaño.

En la Figura 4.3 se puede observar la evolución de un proceso de extrusión ($\varnothing = 100$ nm) utilizando el equipo extrusor de mayor volumen y donde se utiliza una corriente de nitrógeno para generar la presión necesaria para que la disolución atravesase la membrana.

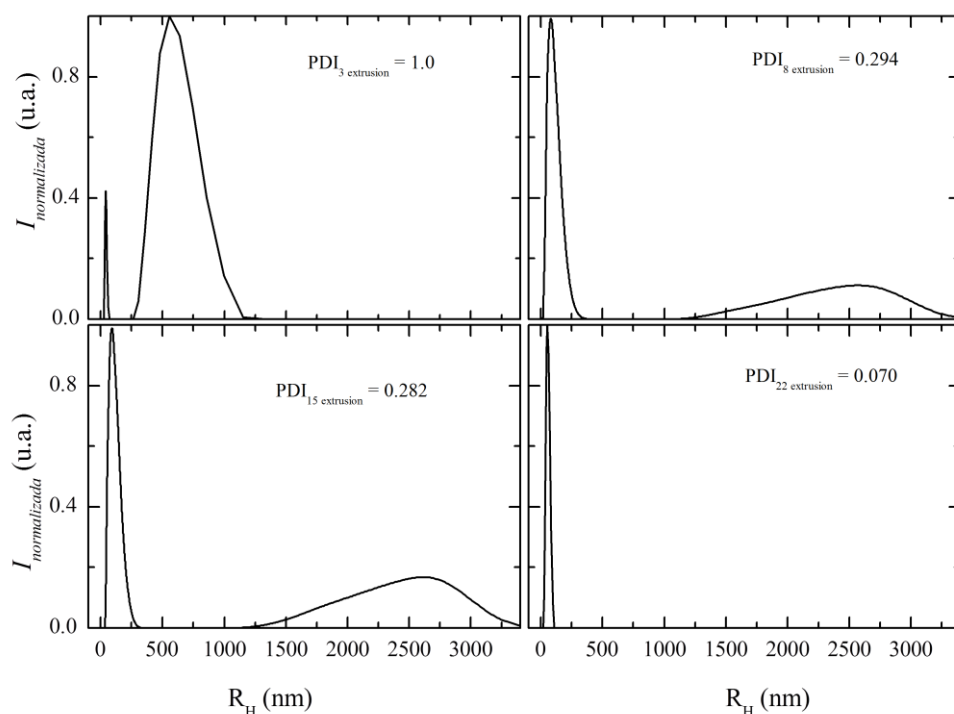


Figura 4.3 Variación de la distribución de tamaños en función de la intensidad a medida que aumenta el número de extrusiones para liposomas de $\varnothing = 100$ nm.

Para la primera extrusión, el valor del PDI es 1, pues la distribución de tamaños es muy amplia. La siguiente imagen corresponde a la séptima extrusión, donde el $PDI = 0.2$. En este caso, a excepción del máximo relativo a la derecha de la imagen, todas las vesículas tienen el mismo tamaño (67.2 nm de radio). Por último, en la decimoquinta extrusión, se obtiene un resultado apropiado, un único pico de radio 46.4 nm y un $PDI = 0.08$.

La función de correlación de la intensidad de la luz dispersada por la muestra es sensible a estos cambios, según se observa en la Figura 4.4. La función que decae antes (en negro) corresponde a la última extrusión. La primera extrusión decae lentamente y en la función debido a la polidispersidad de la muestra se observa ruido.

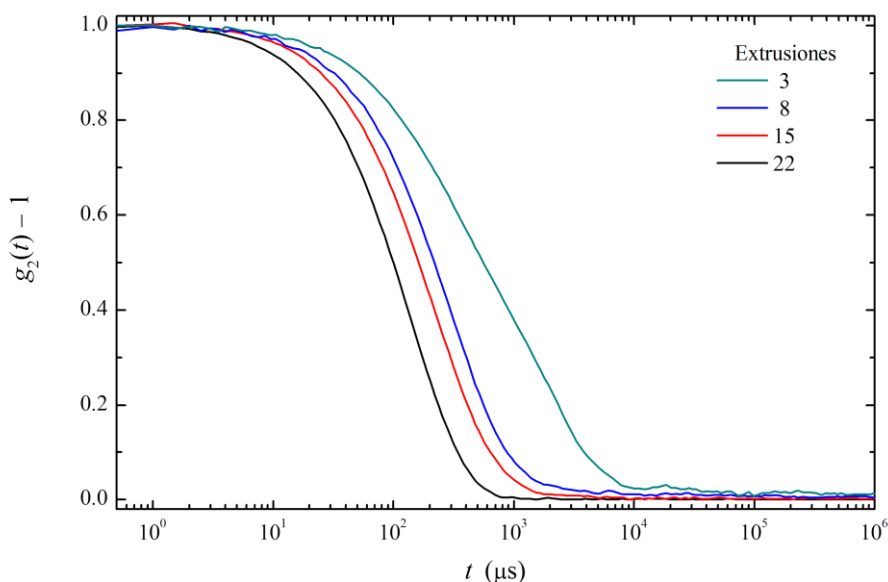


Figura 4.4 Función de correlación frente al tiempo de decaimiento medidas en las muestras obtenidas tras un número diferente de extrusiones.

En ocasiones, se puede intentar deshacer los agregados incrementando la temperatura (sin llegar a alcanzar la temperatura de transición) y sonicando las muestras. Los resultados no son siempre satisfactorios porque parte de los agregados desaparecen, sobre todo si las vesículas no están recubiertas y no hay repulsión entre ellas, pero al mismo tiempo parte de ellas se rompen quedando en la disolución en forma de bicapas lipídicas.

A continuación se caracterizaron los liposomas obtenidos tras la extrusión a través de membranas con diferente tamaño de poro. En este sentido, se utilizaron disoluciones formados por DOPC:DODAB (30:70) y DOPC puro que se extruyeron el mismo número de veces, utilizando membranas con distintos tamaños de poro: 100, 200 y 400 nm. Tras la extrusión, se ha medido el tamaño aparente de los liposomas en disolución mediante la técnica de dispersión de luz dinámica. En la Figura 4.5 se observa la variación del índice de polidispersidad para los liposomas en función del tamaño y del tipo de fosfolípido que se utiliza. En ambos casos se ha comprobado que el índice de polidispersidad aumenta a medida que las vesículas son mayores. Se observa que para el caso de vesículas de 100 nm

el índice de polidispersidad se reduce por debajo de 0.1 mostrando una distribución muy estrecha. Al fabricar liposomas de 200 nm y de 400 nm el índice de polidispersidad se hace mayor hasta valores que son casi tres veces el obtenido para liposomas de 100 nm.

Los liposomas catiónicos permiten una extrusión más cercana al tamaño de poro seleccionado si se compara con los liposomas formados por tan solo fosfolípido puro, como es el caso de liposomas formados por DOPC y liposomas formados por DPPC. El tamaño obtenido para estos liposomas es un poco más grande ya que la membrana lipídica es más flexible. El proceso de extrusión es mucho más fácil pero el proceso de reducción de tamaño es mucho más difícil ya que los liposomas pueden atravesar con facilidad la membrana. Al aumentar el número de extrusiones la polidispersidad disminuye, sea cual sea el lípido del que estén formados. Pero al mismo tiempo se pierde más fosfolípido que queda retenido en la membrana del extrusor, por lo que el sistema de extrusión se optimizó para liposomas

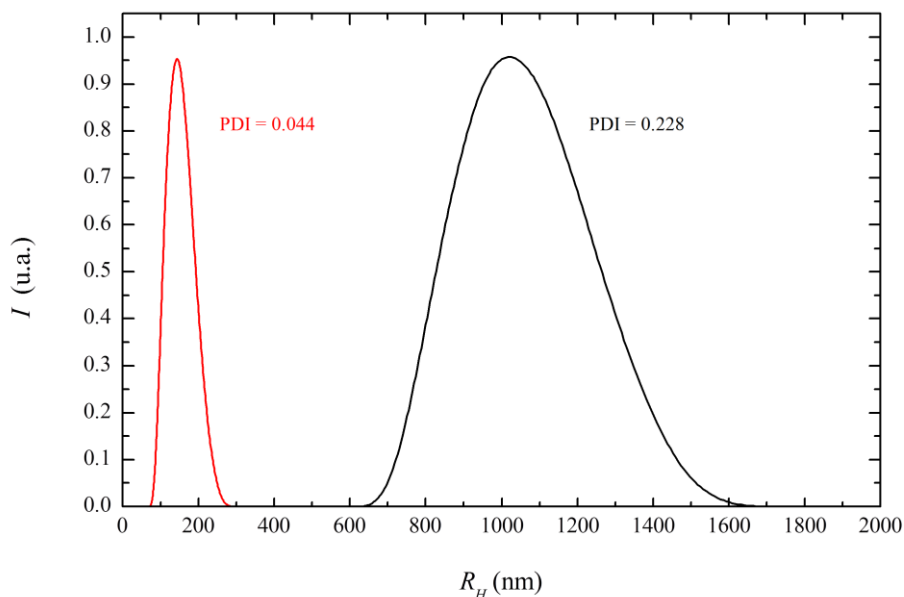


Figura 4.5 Radio hidrodinámico R_H de las vesículas formadas por: (a) DOPC:DODAB (3:1) y (b) DOPC. Las medidas de DLS han sido realizadas a pH 7.4, a 25 °C y a un ángulo de dispersión de 90° utilizando membrans con diferente tamaño de poro. La línea azul para 100 nm, la línea negra para 200 nm y la línea roja para 400 nm.

formados con un solo fosfolípido. En este caso, el número de extrusiones pasa de 30 a 40 para poder asegurar la mínima polidispersidad.

Potencial zeta para liposomas formados por DOPC y DODAB

Este sistema se caracteriza por una densidad de carga independiente del pH del medio con un potencial zeta siempre positivo que tan solo depende de la concentración, tal y como se muestra en la Figura 4. 6 obtenida para liposomas formados por mezclas DOPC:DODAB. Se observa un aumento de potencial zeta cuando la mezcla de DOPC:DODAB está en torno 90:10. Una vez que el valor del potencial aumenta hasta 60 ± 2 mV el potencial zeta de los liposomas es prácticamente constante hasta que se alcanza la relación 30:30. Es a partir de esta relación cuando de nuevo el potencial zeta del liposoma vuelve aumentar hasta valores en torno a 75 mV. La estabilidad mostrada nos permite trabajar con estos liposomas como plantilla para los posteriores recubrimientos.

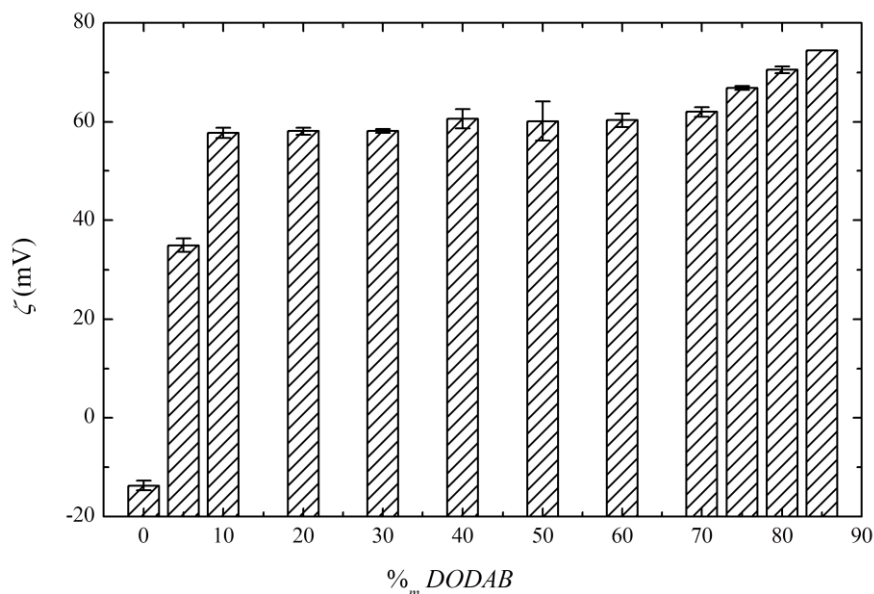


Figura 4. 6 Variación del potencial zeta para liposomas formados por DOPC:DODAB con variación de concentración de DODAB. Medidas realizadas a temperatura ambiente, 25°C y en disolución salina 10 mM después de ser extruidos con un tamaño medio de 100 nm de diámetro.

Dispersión de luz y potencial zeta para liposomas con carácter zwiteriónico

En la Figura 4.7 se muestra el diámetro hidrodinámico para liposomas formados por DPPC extruidos a través de dos membranas de dos tamaños de poro distintos, 100 nm y 1 μm con el correspondiente índice de polidispersidad. La curva obtenida para vesículas de 1 μm posee mayor índice de polidispersidad, la curva tiene una anchura mucho mayor, a pesar de haber seguido el mismo procedimiento durante el proceso de extrusión. En ambos casos se tuvo especial cuidado con la temperatura de extrusión que siempre fue 50°C, por encima de la temperatura de transición del fosfolípido.

El punto isoelectrónico caracteriza a todos los liposomas con carácter zwiteriónico y nos da información sobre la estabilidad del sistema. En esta región, la disolución de liposomas se muestra más inestable y pueden

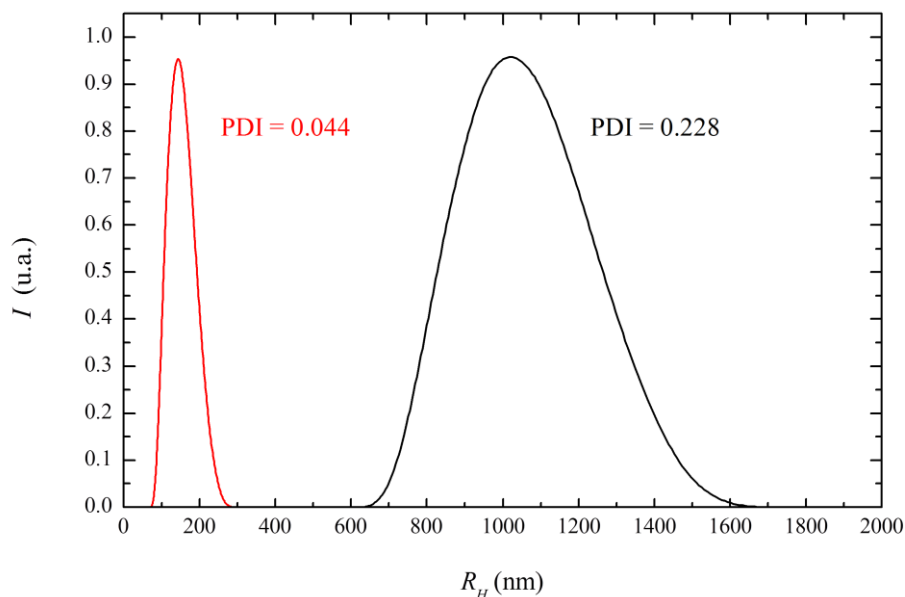


Figura 4.7 Radio hidrodinámico normalizado para liposomas formados por DPPC extruidos en disolución tampón a pH 7.4. La curva roja se corresponde a liposomas de 100 nm de diámetro y la curva negra para liposomas de 1 μm obtenidos tras la extrusión a través de membranas de policarbonato del tamaño mostrado.

aparecer agregados. Por esta razón a continuación se muestran los estudios de pH solo para liposomas cuya carga depende del pH del medio.

En la Figura 4.8 se muestra el comportamiento de tres sistemas formados por liposomas zwitteriónicos: DPPC, DOPC y DPPC:DOPC (70:30). En la mayoría de disoluciones electrolíticas, el potencial ξ de las fosfolípidas tiende a ser negativo a pH básicos debido a la presencia de una capa de aniones adsorbida a los dipolos originados en la cabezas polares zwitteriónicas^[66]. El punto isoeléctrico calculado para liposomas de DPPC es a un pH 7.0, muy cerca del pH fisiológico, que es al que se trabaja normalmente, para DOPC es 6.5 y para una combinación de DOPC:DPPC (30:70) está entre ambos y corresponde a 6.8, más cercano al valor obtenido para el DPPC ya que contribuye más por estar en mayor proporción. Se observa que la región inestable de estas disoluciones está muy cercana al pH

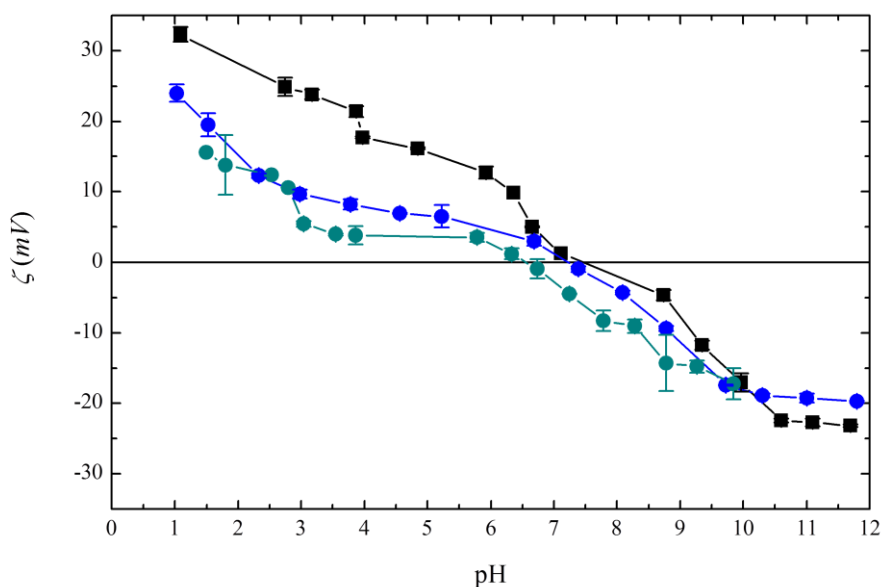


Figura 4.8 Potencial zeta obtenido mediante movilidad electroforética en función del pH para determinar el punto isoeléctrico en liposomas zwitteriónicos en disolución acuosa con concentración salina igual a 10 mM. El tamaño de los liposomas es 100 nm de diámetro y las medidas están realizadas a 25°C. Comparación con el punto isoeléctrico observado para DPPC (■), DOPC (●) y DOPC:DPPC (30:70) (●). El círculo indica la región en la que se sitúa el IEP.

de trabajo, por lo que se debe acudir a alternativas que mejoren la estabilidad en las condiciones de trabajo. Entre las posibilidades se ha estudiado este tipo de sistemas manteniendo el pH constante y utilizando recubrimientos.

Calorimetría diferencial de barrido y Anisotropía

Cuando se trabaja con liposomas formados por DPPC se debe conocer la temperatura de transición de fase gel cristalina a líquido que facilite el poder trabajar con ellos. Esta temperatura, de la que ya se ha hablado en la sección de Los lípidos es sensible a la presencia de polímeros, impurezas^[105],... y es muy importante para el caso en que su valor esté cerca de la temperatura de trabajo. Por esta razón se caracterizaron estos sistemas con dos técnicas. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es la técnica más directa y precisa para determinar transiciones conformacionales^[356, 357] y/o cambios de fase al modificar la temperatura^[358]. Permite medir la

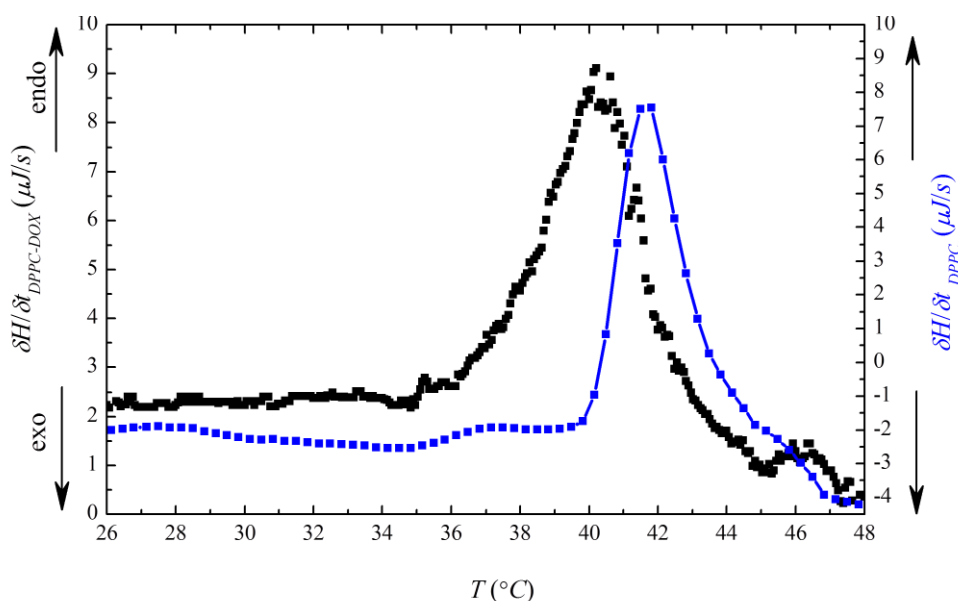


Figura 4.9 Calor liberado en liposomas de 1 μm formados por DPPC (■) y encapsulando DOX (■). Los experimentos han sido realizados en disolución tamponada HEPES a pH 7.4 con fuerza iónica igual a 10 mM NaCl.

capacidad calorífica aparente de una disolución como función continua de la temperatura, a partir de la cual se puede conocer parámetros termodinámicos^[359] asociados a la transición inducida por la temperatura como la entalpía, entropía, energía de Gibbs y capacidad calorífica^[102].

En la Figura 4.9 se observa que la transición térmica de DPPC tiene lugar aproximadamente a 41°C, valor que está de acuerdo con los datos bibliográficos. Además se observa la pre-transición, característica en este lípido, que corresponde a valores de 34-36°C^[360].

Otra forma de determinar esta temperatura de transición es mediante el valor de la anisotropía, obtenido mediante la técnica de despolarización, de la que ya se ha hablado en el capítulo de Técnicas experimentales. Esta técnica necesita la presencia de una sonda y la elegida es NBD-PC incluida en todos los sistemas estudiados para que permita su comparación. Las medidas se realizaron en el intervalo de temperaturas 12-55°C con una velocidad de aumento de temperatura de 20°C/hora. De los resultados

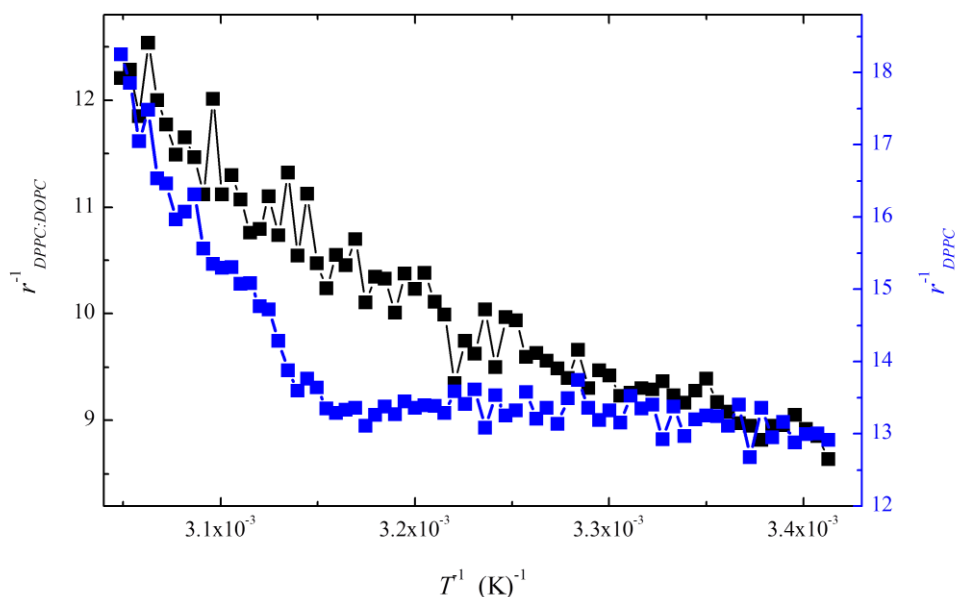


Figura 4.10 Variación de la anisotropía, r , para liposomas formados por DPPC (■) y liposomas formados por DPPC:DOPC (■) en disolución tamponada a pH 7.4 y con una concentración de 10 mM NaCl. El tamaño de los liposomas es de 100 nm de diámetro.

obtenidos se representa el inverso de anisotropía frente al inverso de temperatura, y con la ecuación de Perrin^[276] se determina la temperatura buscada. Para el caso de DPPC, se ha encontrado en la bibliografía el valor de r_0 que es 0.297^[360].

Para calcular gráficamente la temperatura de transición se realiza el ajuste lineal para cada una de las pendientes y el punto de corte de ambos ajustes es el valor buscado. Para el caso de DPPC la temperatura de transición obtenida experimentalmente es $44 \pm 3^\circ\text{C}$ y para la mezcla DPPC:DOPC $T_M = 39 \pm 3^\circ\text{C}$ (Figura 4.10). Considerando que $T_M(\text{DPPC}_{\text{puro}}) = 41^\circ\text{C}$, el resultado obtenido es coherente, además de que su gráfica presenta un cambio brusco donde se produce el cambio de fase.

En la Figura 4.11 se muestra la variación de anisotropía para el sistema de DPPC, de nuevo, y cargado con DOX. Se muestra la diferencia en la pendiente al llegar a la temperatura de pre-transición que afecta mucho más a liposomas sin ningún aditivo que al añadir polímero en la bicapa y a liposomas sin ningún aditivo que al añadir polímero en la bicapa y

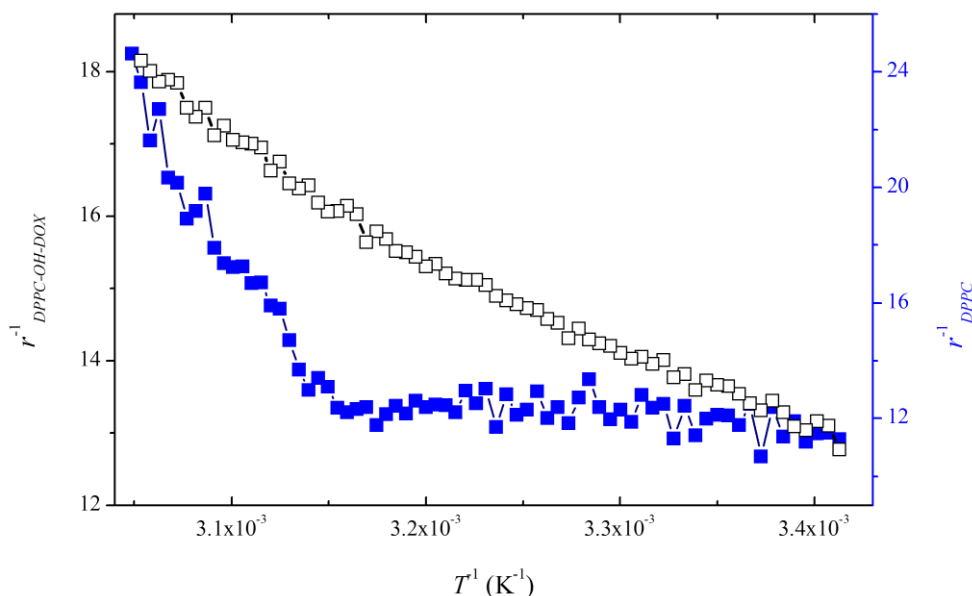


Figura 4.11 Variación de la anisotropía, r , para liposomas formados por DPPC (■). Comparación de la variación de temperatura de transición para liposomas modificados por polímero y cargados de DOX (■). Las disoluciones son de disolución tamponada HEPES a pH 7.4.

fármaco en el interior del liposoma. Cuando el fármaco se encuentra en el interior del liposoma que sirve como apantallamiento ^[361] es difícil obtener la temperatura de transición. Además, el no tener el valor de r_0 para esta sonda se trabaja con el valor obtenido a partir de los experimentos con DSC.

4.1.2 Adsorción alternada capa a capa de PSS/PAH

Dispersión de luz y Potencial zeta

Los polielectrolitos adsorbidos sobre la superficie de los liposomas proporcionan capas que modifican la superficie del liposoma y con ello algunas propiedades fisicoquímicas. El número de capas adsorbidas sobre el liposoma dependerá del tamaño, tipo de liposoma, de los polielectrolitos, y

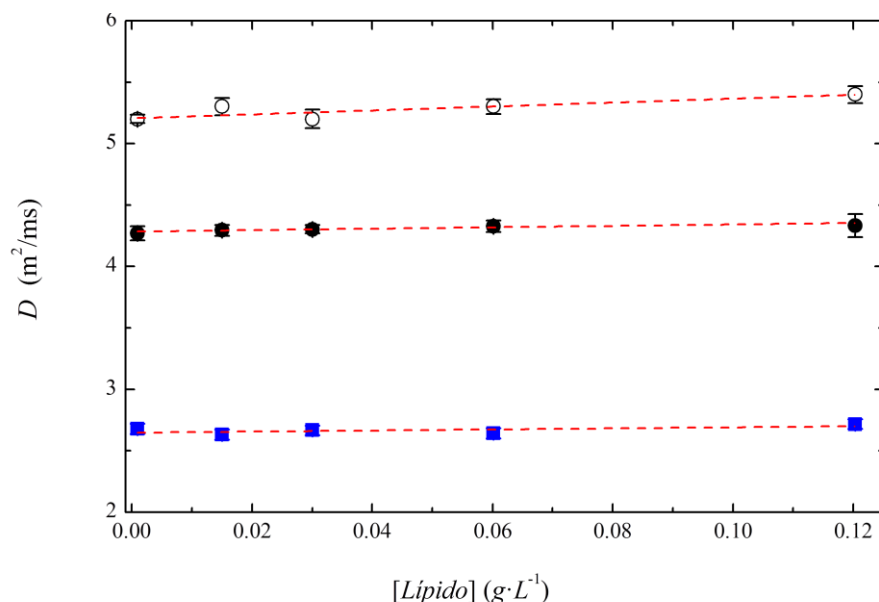


Figura 4.12 Coeficientes de difusión para disoluciones de liposomas DOPC:DODAB con un radio medio de 50 nm sin capas (\circ), con una capa (\bullet) y con cuatro capas (\blacksquare). Las medidas han sido realizadas a temperatura ambiente, en agua miliQ y en muestras diferentes para cada dilución. La línea roja punteada indica el ajuste de los datos para todos los casos.

Tabla 4.2 Coeficiente de difusión a dilución infinita para el sistema de liposomas DOPC:DODAB (30:70)

Liposomas DOPC:DODAB (30:70)	Coeficiente de dilución $D_0 \cdot 10^{-15}$	Desviación estándar $(\pm) \cdot 10^{-15}$
Sin recubrimiento	5.20	0.02
(PSS/PAH)_{0.5}	4.28	0.007
(PSS/PAH)₂	2.65	0.02

de otras variables que han de ser tenidas en cuenta al diseñar nuestro sistema. Este estudio se ha centrado en liposomas catiónicos que se recubren con polielectrolitos de carga contraria y donde la técnica capa a capa ha sido aplicada hasta obtener liposomas recubiertos con cuatro bicapas de polielectrolitos. Pero antes de presentar los resultados sobre los radios obtenidos para liposomas con un número de capas se realizó un estudio para ver si las diluciones de vesículas influyen en el cálculo del coeficiente de difusión, y con ello en el valor del radio hidrodinámico. Se ha observado que para liposomas unilamelares pequeños, la dilución no afecta al valor obtenido, como se puede observar en las diluciones que aparecen en la Figura 4.12:

A partir de la Figura 4.12 se puede obtener el coeficiente de dilución infinita, D_0 , del punto de corte con el eje y a partir del ajuste realizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.2 y se observa que la dilución no afecta a los resultados obtenidos. El tamaño antes de la adsorción del polielectrolito obtenido en todos los casos, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, es de 50 nm de radio, que coincide con el tamaño de poro utilizando para estos liposomas.

El problema es que cuando hay contribuciones de liposomas de varios tamaños, si las distribuciones de los dos tamaños no son muy diferentes, pueden solaparse y, por lo tanto, no se puede conocer exactamente el valor de los radios. Con el fin de evitar esto, se estudia la función de correlación en cada muestra y se analiza con los métodos descritos en la sección **2.1 Técnicas dispersivas**. Con este procedimiento se puede separar todas las contribuciones de los distintos tamaños que puede haber en las dispersiones.

De este modo, si se representa la inversa del tiempo de decaimiento con respecto al vector de onda, se obtiene una relación lineal en la que la

pendiente es el coeficiente de difusión de la muestra. Las medidas se realizan a varios ángulos, y se hacen medidas por duplicado cada 5° para evitar errores sistemáticos. A continuación se muestra el proceso de obtención del radio hidrodinámico a partir del coeficiente de difusión. Si se representa el inverso del tiempo frente al cuadro del vector de onda se puede determinar, el coeficiente de difusión a través de la ecuación (4.1).

En la Figura 4.13 se describe el proceso de obtención de los coeficientes de difusión. Para vesículas sin recubrimiento la pendiente es mayor que para

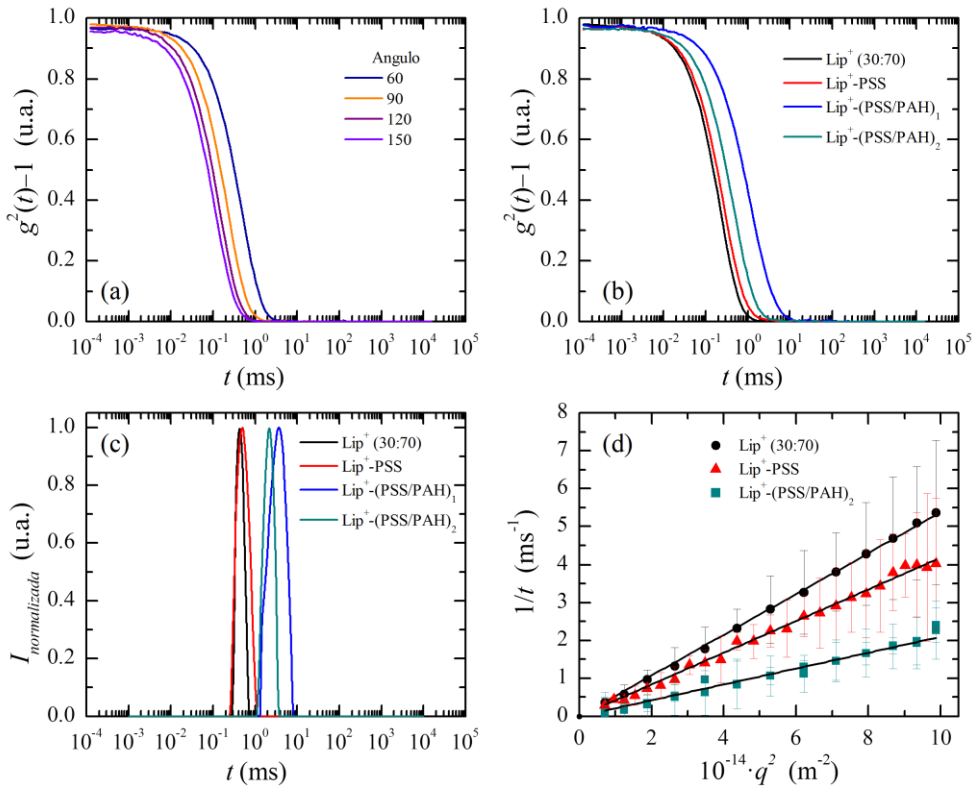


Figura 4.13 Obtención del coeficiente de difusión: (a) representa las funciones de correlación de una muestra a diferentes ángulos; (b) representa la función de correlación para varias muestras a 90° ; (c) Tiempo d decaimiento a 90° para diferentes muestras; (d) Variación del tiempo de la inversa del tiempo de decaimiento frente al cuadrado del vector de onda para diferentes muestras. Los errores representan las anchuras de las distribuciones de tiempos de relajación.

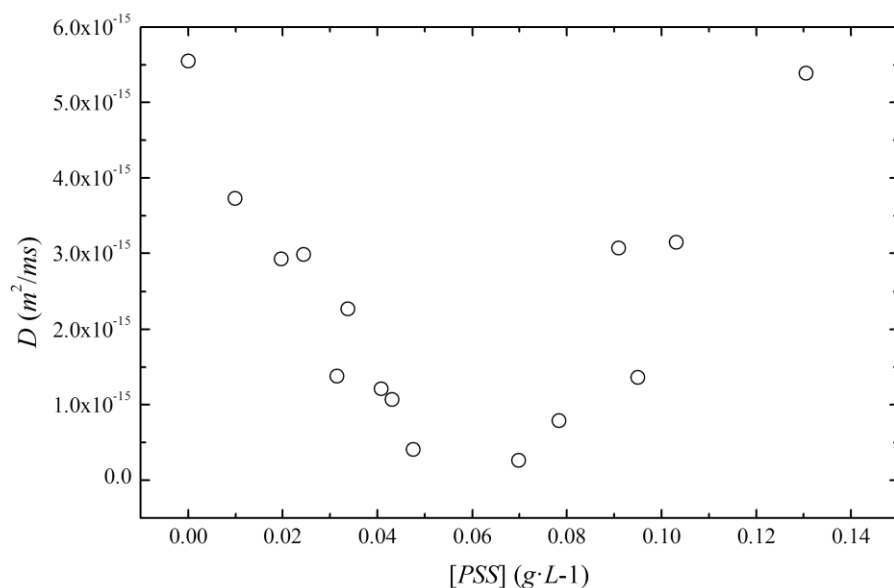


Figura 4.14 Coeficiente de difusión para vesículas de 100 nm formadas por DOPC:DODAB en una relación 70:30 en disolución salina con 10 mM de NaCl a 25°C a medida que se añade PSS.

el caso de las vesículas con una capa. De la pendiente se obtiene el valor del coeficiente de difusión, y se calcula, a partir del coeficiente de difusión el radio hidrodinámico, teniendo en cuenta la temperatura y viscosidad obtenidas del equipo en cada medida.

Esta parte se va a centrar en el estudio de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) y de su recubrimiento con PSS. Si en el proceso del recubrimiento se estudia la variación del coeficiente de difusión a medida que se añade polielectrolito, se observa cómo el coeficiente de difusión pasa por un mínimo hasta que se produce el recubrimiento completo. En la Figura 4.14 se observa la concentración a la que el coeficiente de difusión adquiere un valor mínimo, y por lo tanto, un valor de radio hidrodinámico máximo.

Con estas medidas de dispersión de luz (DLS) el radio hidrodinámico de calculado está relacionado con la carga del sistema a estudiar, según lo planteado por Velegol y colaboradores^[95]. En la Figura 4.15 se muestra la variación del radio hidrodinámico y de carga en función de la concentración del polielectrolito. Es una evidencia experimental de los dos fenómenos que

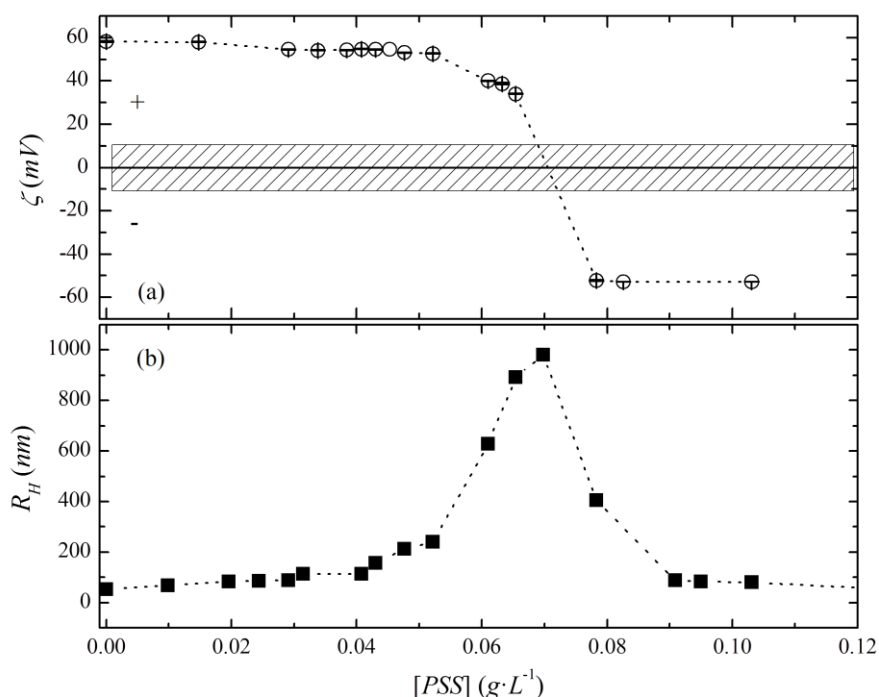


Figura 4.15 (a) Potencial zeta o y (b) radio hidrodinámico de una suspensión de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) en función de la concentración del polielectrolito aniónico, PSS. La barra horizontal en (a) indica el error debido al equipo utilizado y que debe tenerse en cuenta a la hora de considerar la densidad de carga positiva o negativa.

ocurren en la disolución de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) cuando se ponen en contacto con el polielectrolito aniónico, PSS y se denominan inversión de carga y condensación.

La Figura 4.16 representa el valor del radio hidrodinámico en función de potencial zeta para el sistema formado por DOPC:DODAB (30:70). En la figura también se han representado los valores obtenidos para vesículas formadas por otros lípidos con recubrimientos desde el par PSS/PAH hasta PGA/PLL. Los puntos que se sitúan en valores más altos de radio hidrodinámico representan liposomas recubiertos hasta con cuatro capas. El potencial teórico representado se ha construido a partir de las relaciones

matemáticas, establecidas por Velegol – Twar, entre radio hidrodinámico y potencial zeta.

El estudio del recubrimiento con PSS para liposomas formados por la mezcla de DOPC:DODAB se ha extendido para diferentes proporciones de ambos con lo que la carga positiva que caracteriza el sistema dependerá de la cantidad de DODAB presente en el liposoma y esta carga a su vez, afecta a la cantidad de polielectrolito adsorbido. De esta forma, cuando en las disoluciones de liposomas de carga positiva se añade un polielectrolito de carga contraria, por interacciones electrostáticas se produce una adsorción del polielectrolito sobre la superficie del liposoma que se traduce con una inversión de carga del sistema observándose una variación de potencial zeta de un valor positivo a un valor negativo. Durante este proceso de inversión de carga existe un momento en el que el valor de la carga se iguala y la medida del potencial zeta es igual a cero y como en el punto de neutralización de los liposomas el sistema es inestable y tienden a agregarse.

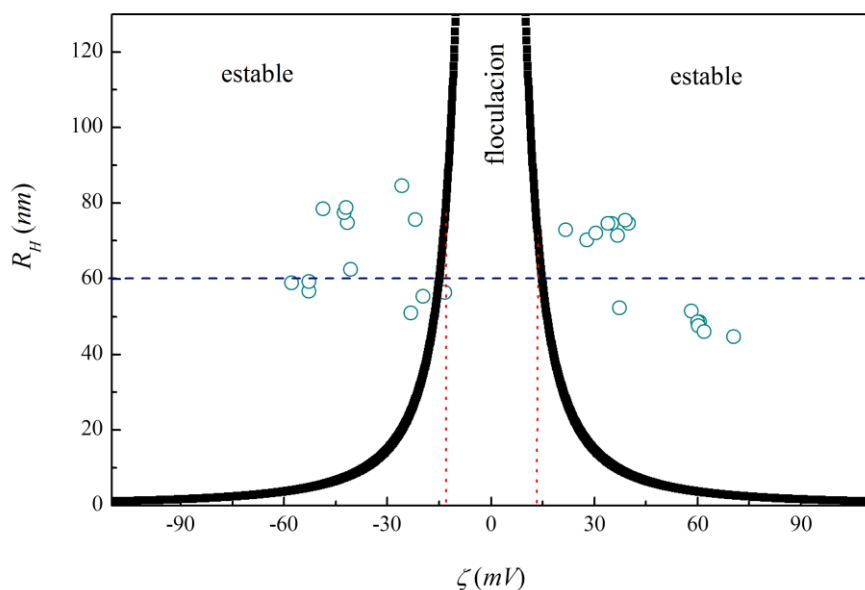


Figura 4.16 Radio hidrodinámico frente al potencial zeta para vesículas formadas por fosfolípidos recubiertas con polielectrolitos en disolución salina con una concentración de 10 mM. Las líneas continuas simétricas indican el intervalo inestable de las disoluciones que encierran la zona denominada Potencial de Velegol-Twar.

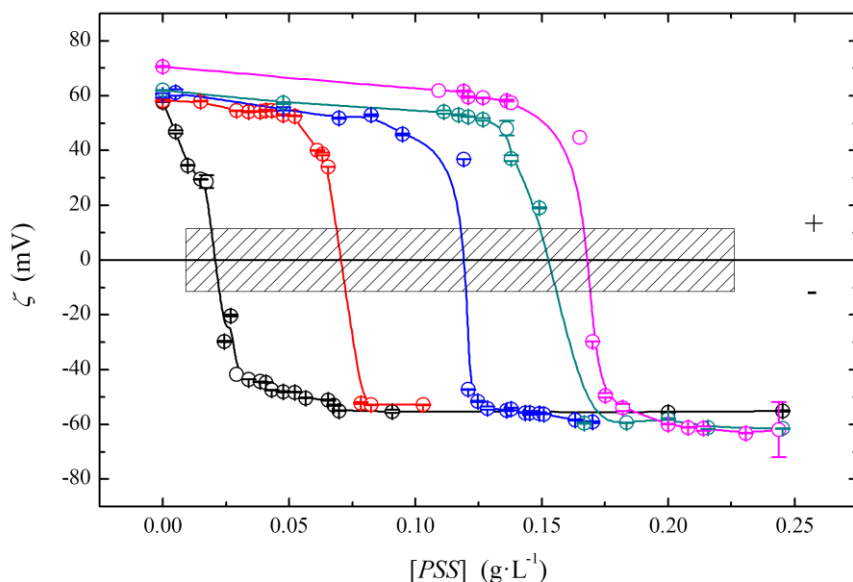


Figura 4.17 Potencial zeta frente a la concentración de PSS. Las vesículas están formadas por DOPC y DODAB: 10% DODAB (\circ), 30% DODAB, (\circ), 50% DODAB, (\circ), 70% DODAB (\circ) y 80% DODAB, (\circ). Todos los datos corresponden a 25°C y a un volumen total de 2 mL.

Inicialmente se discutirá en detalle la adsorción de la primera capa. Se comienza con potencial zeta positivo, propio de los liposomas con los que se está trabajando y se va añadiendo disolución de polielectrolito de carga contraria inmerso en el mismo disolvente y con la misma fuerza iónica. A medida que se añade más polielectrolito, el potencial zeta va disminuyendo hasta hacerse negativo pasando por cero. Si se continúa adicionando polielectrolito con carga negativa, provocaremos que el potencial sea más negativo, hasta llegar a un punto en el cual el potencial permanece constante a pesar de seguir añadiendo más polielectrolito. En este punto, en el que se producirá la inversión de la carga, será en el que la vesícula se considere completamente recubierta.

La metodología es la siguiente: se añade un volumen de disolución de polielectrolito a la dispersión de vesículas, se calcula la concentración de polielectrolito añadido en cada momento a partir del volumen añadido. En el proceso de adsorción alternada la separación del polielectrolito en exceso no

adsorbido se realiza por centrifugación. Finalmente la concentración de polielectrolito se representa frente al potencial zeta. En la Figura 4.17 se observa que el valor para el cual el potencial zeta es cero se encuentra en torno a un valor de concentración de polielectrolito dependiente de la carga de la vesícula que se está recubriendo. El estudio incluye la mínima cantidad de DODAB añadida (5%_m) hasta el máximo (90%_m) pero por claridad en la gráfica únicamente se muestran los datos más representativos. El punto de neutralización se produce a mayor concentración de polielectrolito a medida que aumenta la carga positiva de la vesícula. Una vez obtenidas las gráficas de recubrimiento para vesículas con diferente carga iónica, se selecciona el punto de neutralización para cada proporción de carga positiva. Se observa que alrededor del punto de neutralización no hay medidas de potencial zeta ya que el sistema es inestable y las vesículas agregan (zona rayada representada en la gráfica).

Si se representa la proporción de DODAB con respecto a la

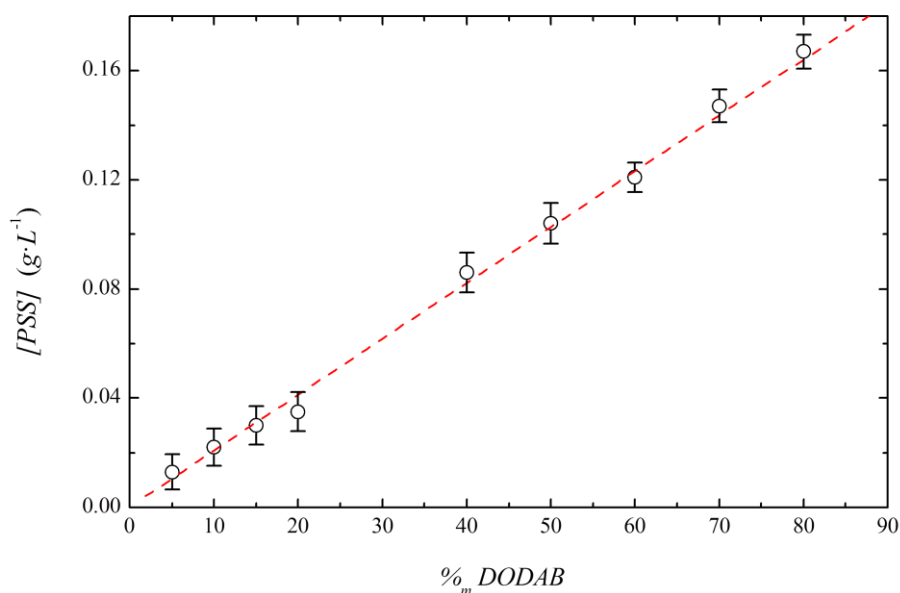


Figura 4.18 Variación de la concentración de polielectrolito aniónico PSS necesaria para alcanzar el punto de neutralización en función del %_m de DODAB en la vesícula. La concentración de las vesículas es constante y la temperatura de medida es 25°C. La recta punteada representa el ajuste lineal de los puntos pasando por cero.

concentración de PSS que corresponde al punto neutralización de cada tipo de vesícula, se observa una evolución lineal cuya ordenada en el origen es igual a cero. La Figura 4.18 muestra que la concentración de PSS a la cual $\zeta = 0$ crece linealmente con la proporción de DODAB, por lo que es posible calcular la cantidad de PSS a partir de medidas de ζ y la proporción de DODAB.

Para el segundo recubrimiento se ha realizado un estudio similar. Al añadir PAH se produce una compensación de cargas, de forma que recubre la vesícula, obteniendo los resultados que se muestran en la Figura 4.19. Para el caso de la segunda capa, la inversión de carga requiere prácticamente la misma concentración de PAH independientemente de la carga original de la vesícula plantilla. Este resultado confirma que el sistema Liposoma-PSS tiene una carga independiente del contenido en DODAB del liposoma plantilla inicial y sugiere que formadas las dos

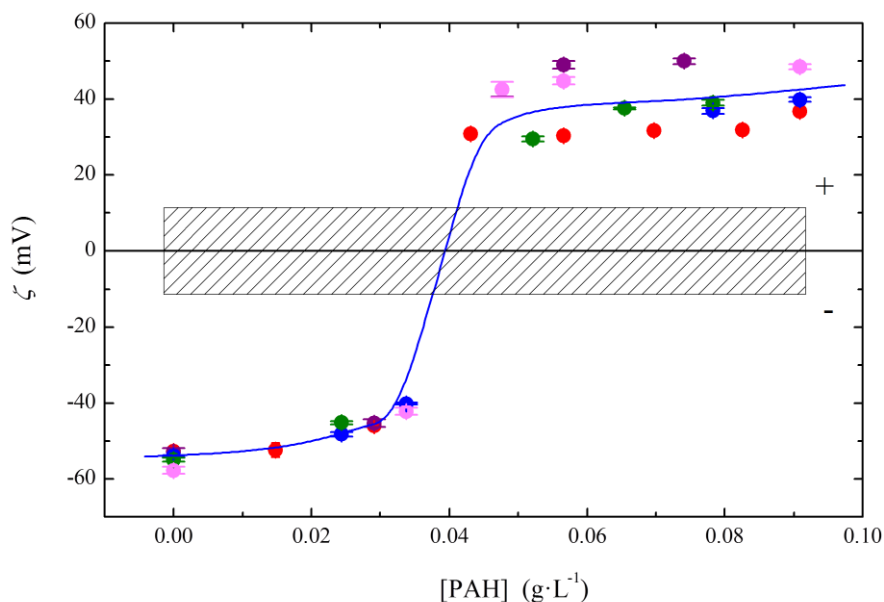


Figura 4.19 Variación de la concentración de polielectrolito catiónico, PAH en función de la carga del liposoma formado por DOPC y DODAB. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: 30:70, (●), 40:60, (●), 50:50, (●), 60:40, (●), 80:20, (●). Las medidas han sido realizadas en disolución salina 10 mM NaCl y tras centrifugar las muestras y eliminar el complejo inter-polielectrolito.

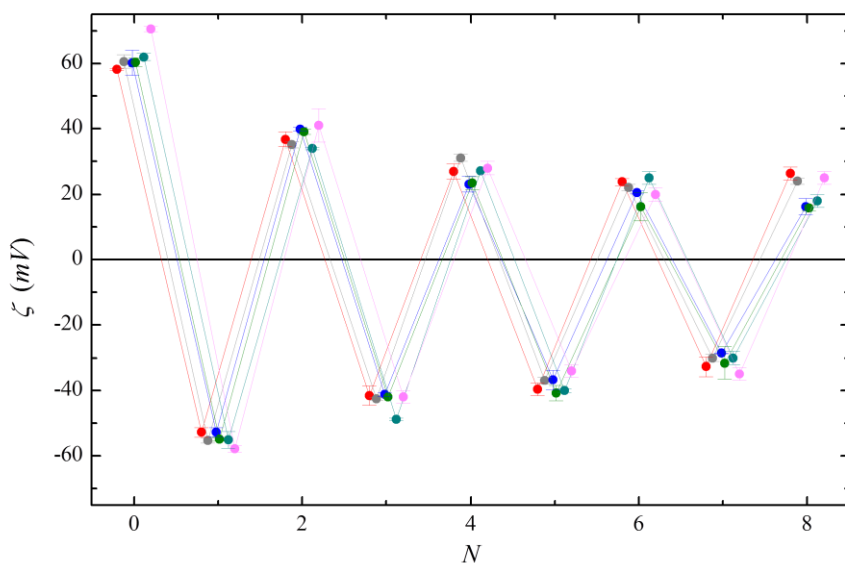


Figura 4.20 Variación del potencial zeta en función del número de capas de PSS/PAH adsorbidas sobre los liposomas formados por DOPC y DODAB y medidos a 25°C. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: ● para 30:70, ● para 40:60, ● para 50:50, ● para 60:40, para ● 70:30 y para ● 80:20.

primeras capas, la formación de la tercera capa debería producirse siguiendo el mismo protocolo.

En la Figura 4.20 se puede observar la alternancia en el potencial zeta con el número de capas para las vesículas con distintos porcentajes de DODAB.

Este es el momento de mostrar los resultados con dispersión de luz. En la Figura 4.21 se recogen los coeficientes de difusión de las vesículas plantilla de distinta carga (DOPC:DODAB) durante la adsorción alternada capa a capa de PSS/PAH. Los coeficientes de difusión obtenidos disminuyen al aumentar el número de capas lo que corresponde a un aumento del tamaño de la cápsula, como es de esperar. Los coeficientes de difusión después del primer recubrimiento, son muy similares lo que indica que el sistema liposoma-PSS formado es estable, reproducible e independiente del contenido de DODAB en el liposoma plantilla. Las medidas de DLS se realizaron a 90° para las vesículas formadas por mezclas de DODAB y DOPC.

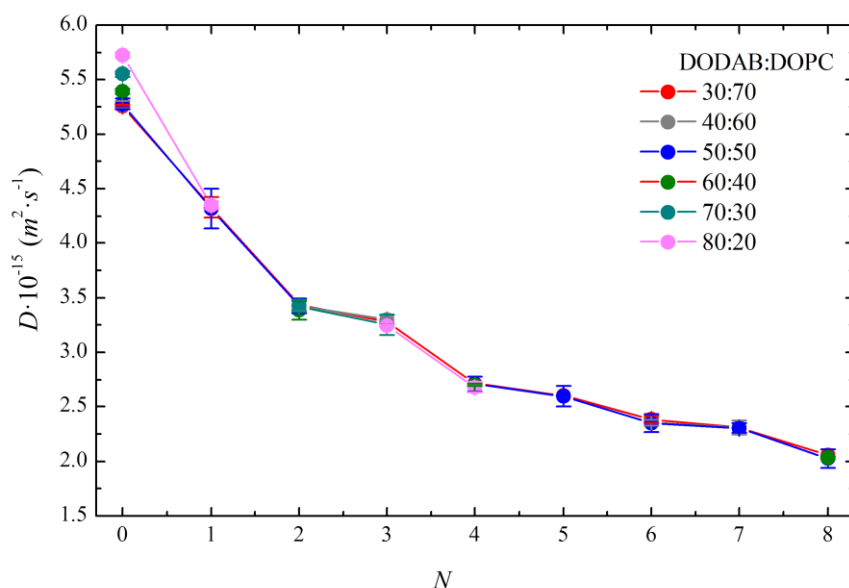


Figura 4.21 Coeficiente de difusión para vesículas con diferente densidad de carga. Medidas realizadas a 25°C para vesículas de 100 nm de diámetro en disolución salina 10 mM NaCl. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: ● para 30:70, ● para 40:60, ● para 50:50, ● para 60:40, ● para 70:30 y ● para 80:20.

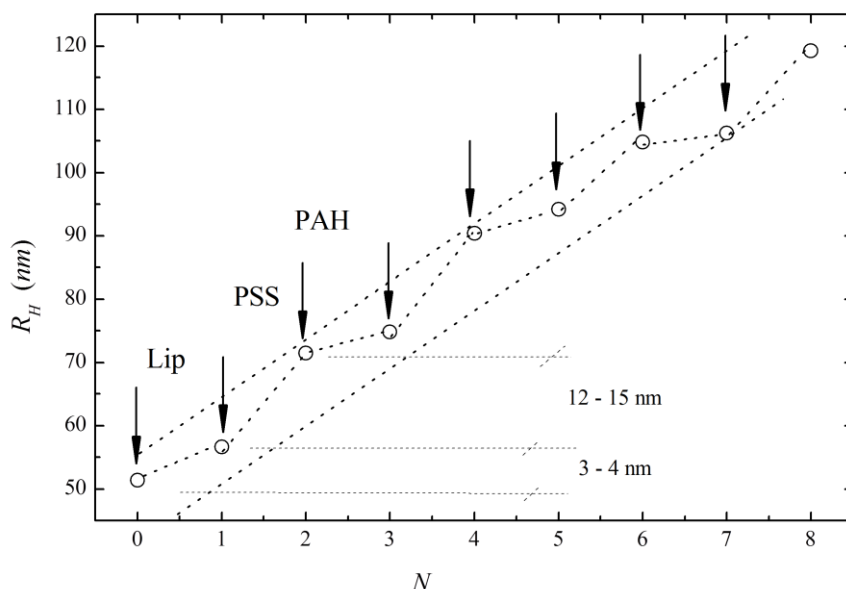


Figura 4.22 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas con 30%_m de DODAB y 70%_m de DOPC.

En la Figura 4.22 se ilustra la variación del radio hidrodinámico en la adsorción alternada del sistema (DOPC30%DODAB70%)-(PSS)_n-(PAH)_m desde $n=1$, $m=0$ hasta $n=m=4$. Como se puede observar, aparece un efecto par-impar como consecuencia de que las capas de PSS tienen espesores de 3-4 nm mientras que las capas formadas por PAH el espesor es del orden de 12-15 nm.

Microscopía crio-electrónica

La técnica de microscopía crio-electrónica ha permitido confirmar la forma y la estructura de liposomas obtenidos por extrusión. En estos experimentos hemos utilizado liposomas de tamaño de 100 nm. Las muestras preparadas estaban en disolución salina con una concentración de 10 mM. Todas las imágenes pertenecen a liposomas catiónicos formados por DODAB:DOPC, con una relación molar de 30:70 y los polielectrolitos elegidos para recubrir estos liposomas son PSS/PAH en disolución acuosa con una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de polielectrolitos caracterizada mediante DLS.

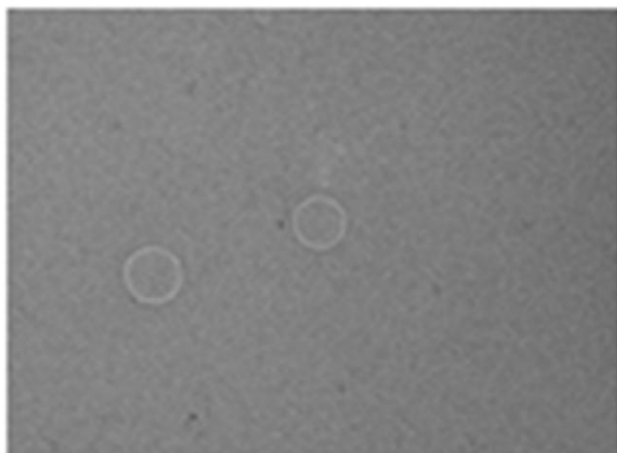


Figura 4.24 Crio-TEM de vesículas formadas por DODAB:DOPC (relación 30:70) sin recubrir con una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

En la Figura 4.24 se muestra una fotografía del sistema DOPC:DODAB tomada con crio-TEM en la que se observan liposomas unilamelares esféricos con un tamaño medio de 100 nm de diámetro con baja polidispersidad. La línea más nítida que se observa en la fotografía con forma esférica y que separa el fondo del interior corresponde a la bicapa lipídica del liposoma. Esta bicapa lipídica separa dos zonas que poseen la misma densidad electrónica, ya que tanto dentro como fuera de la membrana

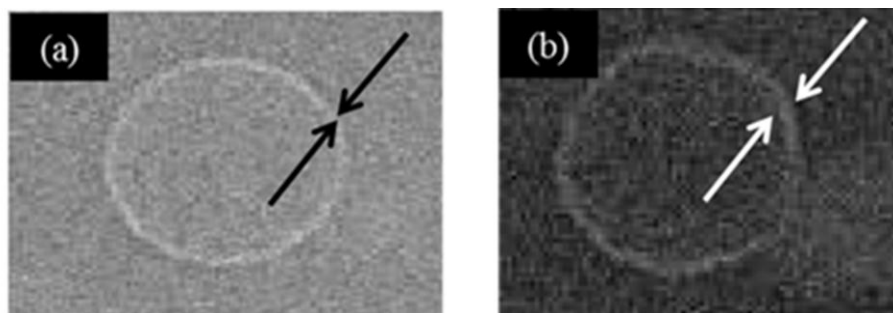


Figura 4.23 Crio-TEM de (a) vesícula sin recubrimiento y (b) vesícula con cuatro capas de PSS/PAH en disolución acuosa con una concentración de 10 mM NaCl a pH 7.4. La concentración tanto de la vesícula como de los polielectrolitos es de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

la disolución acuosa en la que están inmersos los liposomas presenta la misma fuerza iónica.

En la Figura 4.23 se pueden observar las diferencias existentes entre liposomas recubiertos por polielectrolitos y liposomas sin capas. Para que se puedan observar las diferencias con mayor claridad, se ha recubierto el liposoma con dos bicapas de polielectrolitos, pero es apreciable la diferencia de espesor entre ambas membranas debido a la existencia de los polielectrolitos adsorbidos. Si hacemos uso de los datos obtenidos por DLS, el incremento de espesor es de 18 nm para dos bicapas de PSS/PAH, lo que confirma, junto a los datos de potencial zeta que los polielectrolitos han sido adsorbidos. El procesamiento de las imágenes y el posterior análisis muestra un incremento en el espesor de la bicapa de 14 ± 4 nm, que entra dentro del error experimental.

En la Figura 4.25 se da una visión general de liposomas de 100 nm de tamaño inmersos en disolución acuosa tamponada y con una fuerza iónica de 10 mM. Al comenzar las medidas con el microscopio de barrido se ha de seleccionar la zona a estudiar en profundidad por lo que esta imagen es el primer paso para posteriormente obtener imágenes de mayor resolución. Con esta imagen se observa una muestra muy monodispersa en la que los liposomas se encuentran libremente en la disolución sin apreciar agregados. Al analizar esta imagen y determinar el tamaño de las estructuras esféricas observadas, el tamaño determinado es de 95 ± 10 nm.

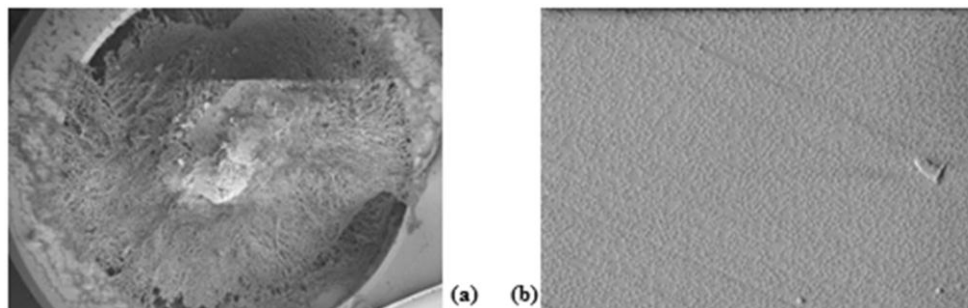


Figura 4.25 (a)Vista total de la muestra depositada sobre el portamuestras con crio-SEM a pH 7.4 y de 100 nm de tamaño. (b)Vista de la población total de liposomas en la muestra observada.

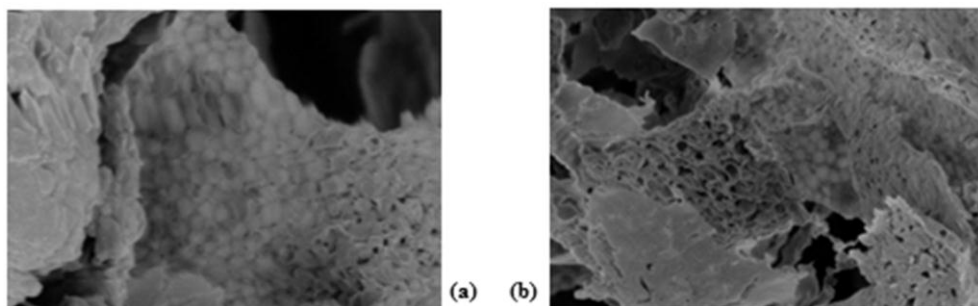


Figura 4.26 Crio-SEM para liposomas de 100 nm donde se observa la tendencia de los liposomas a agregarse con el tiempo. Al mismo tiempo es fácil deducir el tamaño de los liposomas con una gran estadística. (a) y (b) representan la misma zona pero la figura (b) fue tomada con más resolución.

En la Figura 4.26 se muestran liposomas de 100 nm en forma de agregados pero aun así se ha podido medir el tamaño de los mismos que corresponde a 98 ± 4 nm en el 90% de los liposomas medidos.

En la Figura 4.27 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía de barrido de los liposomas obtenidos por extrusión con membrana cuyos tamaños de poro son 100 nm y 1 μ m empleando los fosfolípidos estudiados en este trabajo. Ambas muestras de liposomas se encuentran en disolución

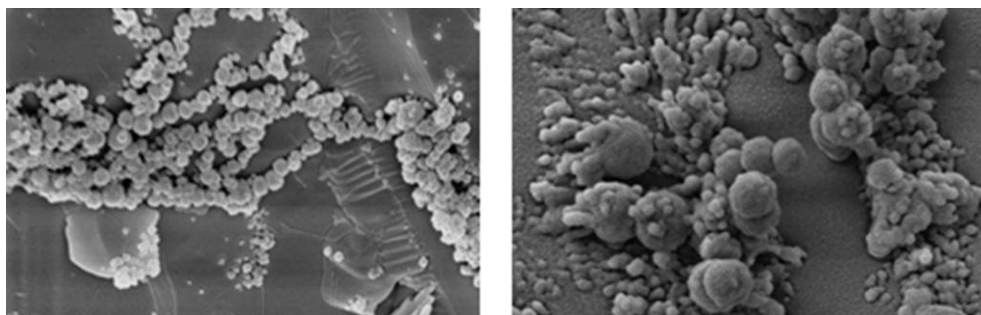


Figura 4.27 Crio-SEM para liposomas de 100 nm y de 1 μ m en disolución tampón HEPES regulando el pH a 7.4. Para proteger las muestras, durante el proceso de preparación se cubrieron con 5nm de platino en una cámara en la que se controla que la temperatura se mantenga a la misma que posteriormente se va a medir, que es -196°C .

acuosa con una fuerza iónica de 10 mM. Se aprecia la forma esférica característica de estas estructuras y del tamaño esperado. Para el caso de liposomas de 100 nm, la muestra es más monodispersa. Además, pueden observarse estructuras en forma de polígonos propias de la congelación de las sales. En la muestra de liposomas de 1 μm se observa mayor polidispersidad. Las estructuras son esféricas ya que corresponden a liposomas pero de tamaños menores al que se desea por extrusión. Esto es normal, ya que a través de la membrana van a pasar liposomas pequeños y no mayores al límite del tamaño del poro, muchos de estos liposomas pequeños se agregan alrededor de los liposomas grandes, pero a pesar de estos agregados es posible observar con claridad los liposomas de mayor tamaño. Estos resultados son coherentes con los datos obtenidos por DLS en los que se observa que el índice de polidispersidad es mayor que para liposomas menores.

FIB es una técnica de microscopía acoplada en el microscopio de barrido de SEM pero en este caso el haz que incide sobre la muestra es de iones. Las muestras que se ha utilizado para crio-SEM se pueden utilizar para medir posteriormente con esta técnica por lo que es interesante a la hora de poder comparar la información obtenida mediante esta técnica.

En la Figura 4.28 se observa el corte transversal realizado a la muestra observada por FIB. Una vez obtenidas las imágenes de liposomas de 100 nm con el haz incidente de electrones, se procede al cambio del tipo de haz que incide sobre la muestra. Con ayuda del software del equipo se establece la potencia de este haz y la selección de la zona en la que se va a producir el corte optimizando la profundidad a la que se desea llegar para observar estas

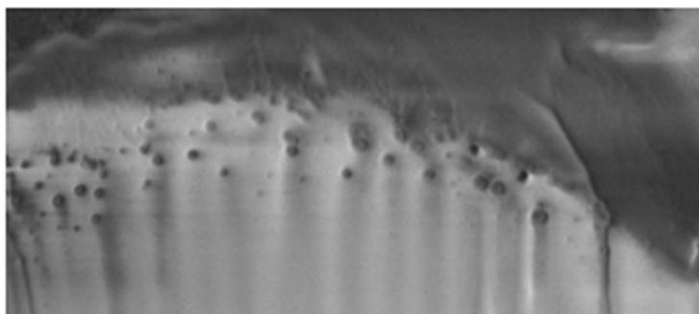


Figura 4.28 Focused Ion Beam (FIB) de liposomas de 100nm en disolución tampón HEPES a pH 7.4 y con una fuerza iónica de 10mM.

estructuras. Ha sido imposible obtener un corte de un liposoma para poder obtener la estructura interna y así confirmar lo observado por crio-TEM ya que incluso trabajando con la menor potencia posible, el liposoma queda destruido pues el haz lo calienta y no es capaz de resistir este calentamiento fundiéndose y formándose bicapas lipídicas. En esta figura se observa el corte desarrollado en una zona mayor, en la que se observan varios liposomas; al realizar el corte con el haz de iones se observa la forma esférica de los liposomas recubiertos con la espesa capa de platino que protege la muestra. Al realizar el cálculo del tamaño de estos liposomas se ha obtenido un tamaño inferior al obtenido por crio-SEM, que corresponde a 60 ± 15 nm, lo cual es debido a que no se está observando la mitad o el liposoma completo sino parte de él.

Estabilidad

Finalmente, presentaremos algunos experimentos para discutir la estabilidad de estos sistemas. Se ha realizado un estudio con respecto al tiempo para liposomas pequeños de 100 nm, recubiertos con el par de polielectrolitos PSS/PAH. Si el potencial zeta y el radio hidrodinámico permanecen constantes, indica que la vesícula sigue recubierta, y que el sustrato no se ha desorbido, sin embargo una variación del potencial zeta y del radio hidrodinámico indica que el sustrato se está desprendiendo, y que las capas de polielectrolito de la vesícula no están enlazadas fuertemente. Este punto es uno de los más importantes, porque para poder desarrollar todas las aplicaciones posibles de las vesículas es necesario, no sólo que se recubran y se forme la multicapa, sino que sean estables durante largos periodos de tiempo.

En este caso, la Figura 4.29 (a) representa la intensidad en liposomas recubiertos con tan solo la primera capa. En este caso se observa un valor del potencial zeta que se mantiene constante hasta siete semanas. Ya en la séptima semana, el valor empieza a variar, debido a que comienza a agregarse el polielectrolito. En la Figura 4.29 (b) se muestra, a partir de los resultados obtenidos mediante DLS, la variación del radio hidrodinámico en los mismos periodos observando para el mismo sistema un tamaño invariable hasta la séptima semana. Después de este tiempo se confirma la formación de estructuras de agregados.

Cuando las vesículas con cuatro capas fueron analizadas (Figura 4.30), el potencial zeta presentaba un valor de 34.90 mV cuyo valor se mantuvo

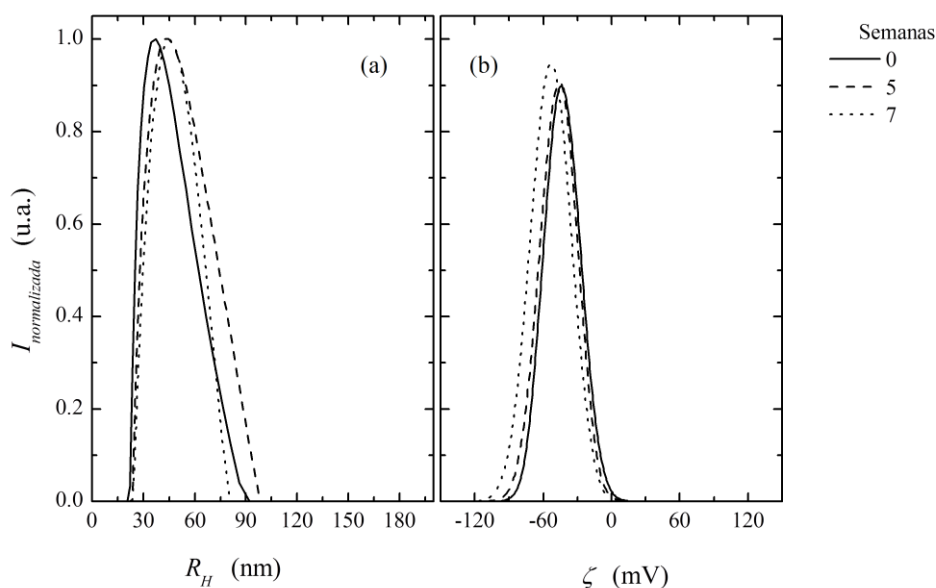


Figura 4.29 (a) Variación de la intensidad normalizada en función del potencial zeta, ζ , en diferentes tiempos y (b) Variación de la intensidad normalizada con el radio hidrodinámico, R_H , en diferentes tiempos después de la síntesis. Las vesículas estaban formadas por 40%_m DODAB con una capa de PSS en disolución salina 10 mM NaCl.

constante hasta que no varió en la segunda medida hasta la tercera semana donde el valor descendía unas décimas, 34.59 mV, y al final alcanzó un valor del potencial zeta de 20.32 mV. Estos valores son un indicación de la estabilidad de la muestra, de forma que la medida a partir de tres semanas disminuye por la formación de agregados en la mezcla. Al mismo tiempo el tamaño también varía, estos agregados son de mayor tamaño aumentando la polidispersidad y por tanto el tamaño medio obtenido a partir de la tercera semana..

Se observa que las vesículas recubiertas con polielectrolito aniónico son más estables que las que quedan recubiertas con el catiónico, posiblemente debido a que el PAH es muy sensible a la temperatura y al pH. Esta sensibilidad del PAH a parámetros externos se refleja en numerosos estudios desarrollados para este par de polielectrolitos^[362].

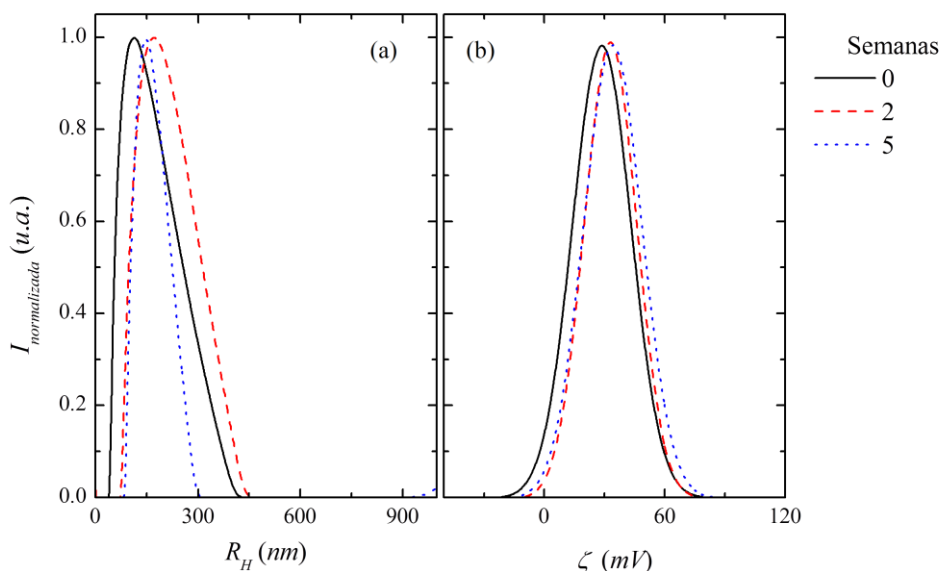


Figura 4.30 (a) Variación de la intensidad normalizada con el potencial zeta, ζ , en diferentes tiempos y (b) Variación de la intensidad normalizada con el radio hidrodinámico, R_H , en diferentes tiempos para vesículas formadas por 40%_m DODAB con cuatro capas del par de polielectrolitos PSS/PAH en disolución salina 10 mM NaCl.

4.1.3 Sistema tipo coloidosoma: Adsorción de partículas y PSS/PAH

Dispersión de luz y Potencial zeta

Además de sistemas basados en liposomas sobre los que se adsorben polielectrolitos, se han obtenido coloidosomas formados por partículas de látex de poliestireno, que recubren la superficie del liposoma. El objetivo de este recubrimiento es un mayor control de la difusión a través de la membrana lipídica y la obtención de sistemas complejos en busca de potenciales aplicaciones en liberación de fármacos. Durante toda esta sección se van a comparar los sistemas tipo coloidosoma con los sistemas ya estudiados formados por liposomas recubiertos con el par de polielectrolitos

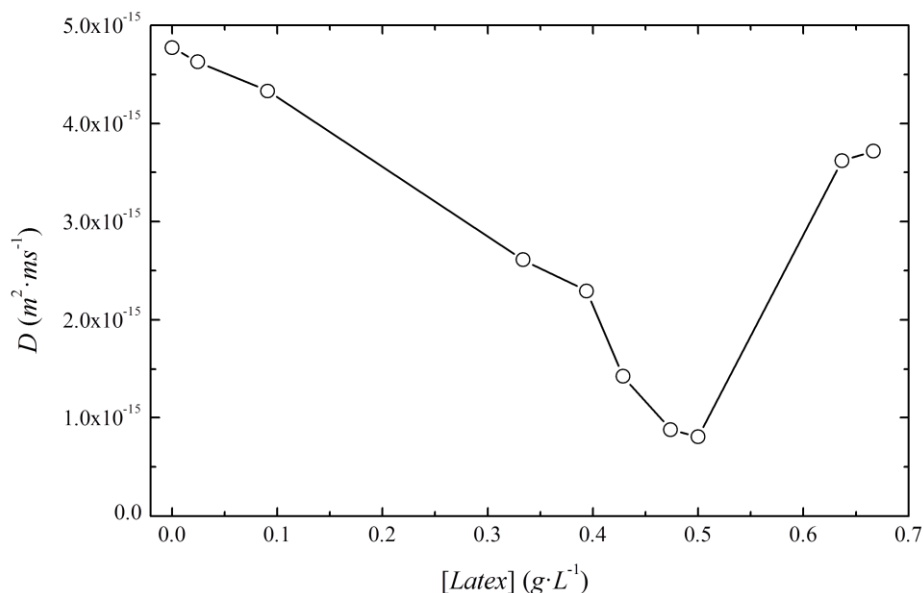


Figura 4.31 Variación del coeficiente de difusión a medida que aumenta la concentración de partículas de látex en la disolución junto a los liposomas sobre los que se adsorbe.

para conocer la existencia o no de un patrón de adsorción y si en ambos casos se sigue, es decir, en el recubrimiento con polielectrolitos y en el recubrimiento con una capa inicial de partículas de látex sobre los liposomas.

En el caso de la adsorción de la primera capa, la cual está formada por partículas de látex de 20 nm de diámetro, el método seguido se basa en la técnica capa a capa. Este método consiste en mezclar la disolución de liposomas y la disolución de partículas de látex y, después de una continua agitación, la mezcla se centrifuga para eliminar el exceso añadido. Como inicialmente se desconoce la cantidad necesaria para recubrir completamente a los liposomas, se procede añadiendo diferentes concentraciones de la disolución de partículas de látex sobre una concentración constante de liposomas. Después de cada adicción se determina el coeficiente de difusión y con ello el tamaño. La Figura 4.31 muestra la variación del coeficiente de difusión durante el proceso de adsorción de las partículas sobre la superficie de los liposomas donde se observa que a medida que aumenta la concentración de partículas, el

coeficiente de difusión se hace menor y con ello el tamaño mayor. Que el tamaño aumente es indicativo de la presencia de agregados, cada vez mayores. Existe un límite en la formación de estos agregados de forma que a pesar de seguir añadiendo más partículas a la disolución de liposomas, el tamaño de los agregados no aumenta. A partir de este valor, el coeficiente de difusión aumenta de nuevo hasta valores cercanos al obtenido inicialmente. Cuando ocurre esto, los agregados disminuyen su tamaño y es un indicativo de la formación de una capa estable alrededor del liposoma y que genera un aumento del tamaño correspondiente al tamaño de las partículas de látex añadidas.

En la Figura 4.32 se muestra la variación del radio hidrodinámico y del

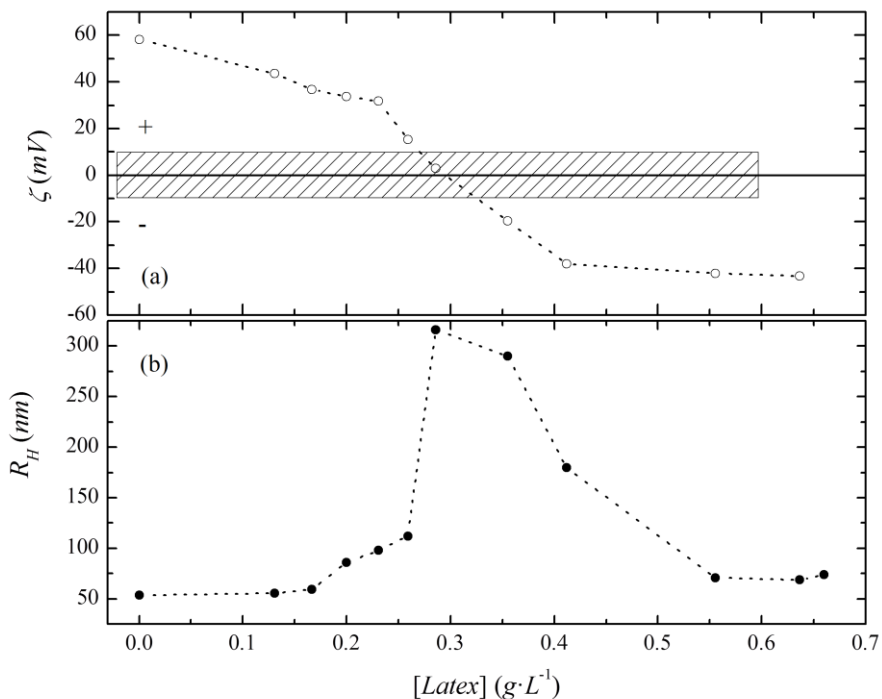


Figura 4.32 (a) Radio hidrodinámico y (b) potencial zeta de una suspensión de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) en función de la concentración de partículas de látex. Se observan claramente las zonas de inversión de carga y de condensación. La zona rayada indica la zona de inestabilidad del sistema donde las medidas no son reproducibles.

potencial zeta con el eje x común, el cual corresponde a la concentración de partículas de látex en la disolución. En este caso, de nuevo se repite el mismo comportamiento observado para la adsorción de polielectrolitos: cuando el potencial zeta alcanza valores cercanos a cero, el tamaño de agregados presentes en la disolución es máximo y es en este punto inestable del sistema donde las medidas no son reproducibles debido a que su estado de agregación cambia con el tiempo y no deben ser tenidas en cuenta para ningún cálculo referido al tamaño del sistema. Lo importante de esta figura es el patrón de adsorción que han seguido las partículas de látex y que coincide con el ya observado con los polielectrolitos.

Así, en la Figura 4.33 se comparan los valores del potencial zeta, ξ , obtenidos en dos tipos de recubrimientos: uno de ellos, las partículas de poliestireno de 20 nm de diámetro y el otro con un polielectrolito, en este caso PSS. Ambos se han realizado a la misma fuerza iónica y a la misma temperatura, 10 mM NaCl y 25°C. Se observa que se necesita más concentración de partículas que de polielectrolito y mayor tiempo de

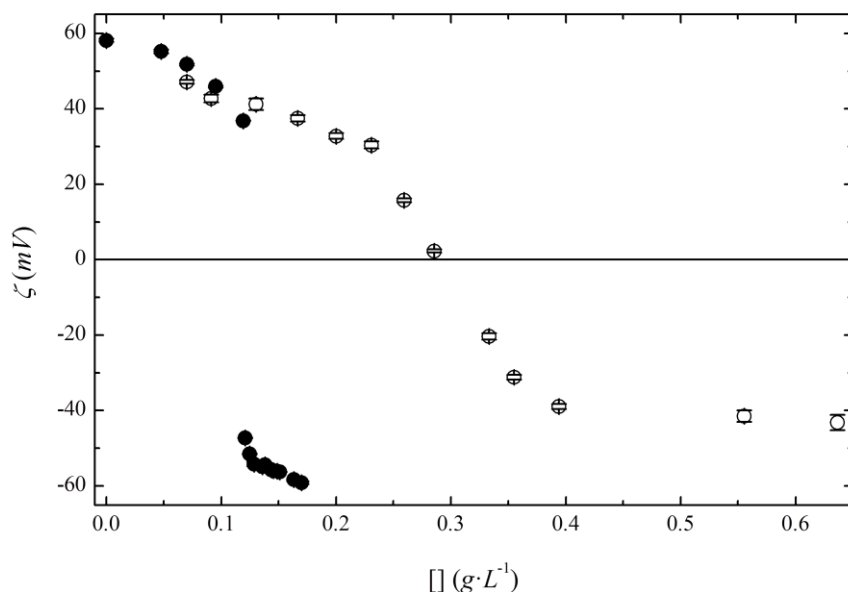


Figura 4.33 Potencial zeta en función de la concentración de PSS (●) y de látex (○) sobre liposomas catiónicos formados por 30% m DODAB. Dependencia del potencial zeta con la concentración de partículas de látex.

adsorción para llegar a producirse un recubrimiento completo del liposoma.

En la Figura 4.34 se muestra la concentración de partículas de látex necesaria para recubrir vesículas con diferente densidad de carga. Se observa que al aumentar la carga positiva del liposoma, se requiere mayor número de partículas de carga contraria que recubran el liposoma. En todos los sistemas se reproduce el valor final del potencial zeta, indicativo de que todos los sistemas de liposomas, independientemente de su carga inicial alcanzan un valor final afectado por el recubrimiento utilizado. El valor final alcanzado es el que corresponde a la carga medida para las partículas en disolución. El proceso de recubrimiento debe realizarse en función de la carga inicial que tenga el sistema, cuanto más cargada esté la vesícula, mayor concentración de partículas será necesaria para invertir este valor. Los valores cercanos a cero no son reproducibles ya que el estado de agregación es máximo pero sirven de guía para observar la tendencia que

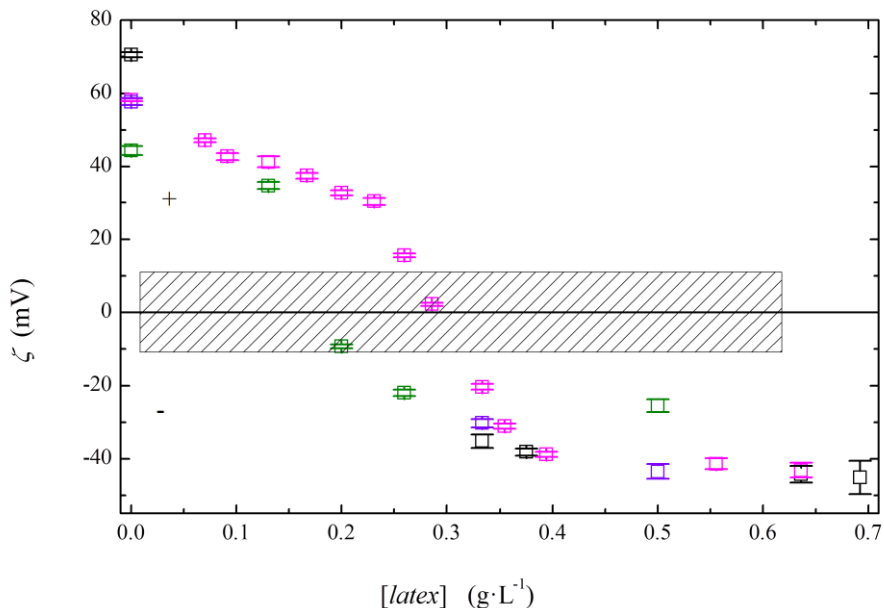


Figura 4.34 Variación del potencial zeta con la concentración de partículas de látex para sistemas formados por liposomas catiónicos con distinta carga iónica. Medidas realizadas en disolución de HEPES 10 mM pH 7.4 a 25°C. Los resultados corresponden a vesículas de DOPC:DODAB (20:80) (□), DOPC:DODAB (70:30) (X), DOPC:DODAB (90:10) (Δ), DOPC:DODAB (95:5) (▲).

sigue la curva del potencial zeta al variar la concentración de partículas de látex en este caso.

Finalmente, en la Figura 4.35 se muestra el potencial zeta, ξ , obtenido para sistemas formados por liposomas catiónicos recubiertos inicialmente con una primera capa de partículas de látex, y las tres posteriores del par de con capas intermedias de polielectrolitos, PSS y PAH hasta que finalmente todos los sistemas son acabados con una capa de nuevo de partículas de látex. Como se puede observar se obtienen valores del potencial zeta, ξ , indicativo de la formación de la capa, muy cercanos dentro del error experimental, para todos los sistemas estudiados. Se puede decir que el sistema se vuelve independiente del tipo de liposoma del que se parte una vez que se produce el recubrimiento del mismo.

En la Figura 4.36 se observa cómo varía la concentración de látex

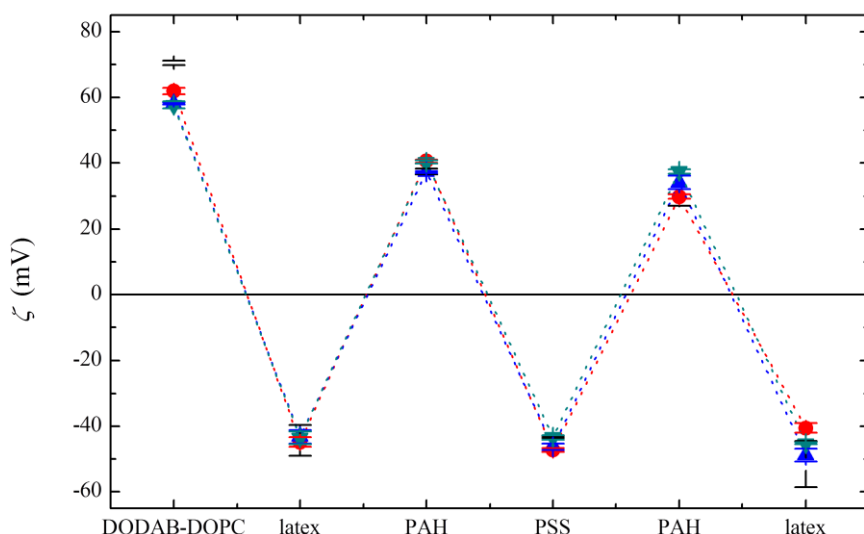


Figura 4.35 Variación del potencial zeta en función del número de capas para liposomas catiónicos con distinta carga iónica donde la primera capa son partículas de látex. La segunda, tercera y cuarta son capas alternadas de PSS/PAH y finalmente de nuevo otra capa de látex. Las medidas son realizadas en tampón HEPES pH 7.4 a 25°C y las gráficas representadas son para DOPC:DODAB 90:10 (▼), DOPC:DODAB 70:30 (▲), DOPC:DODAB 30:70 (●), DOPC:DODAB 20:80 (■).

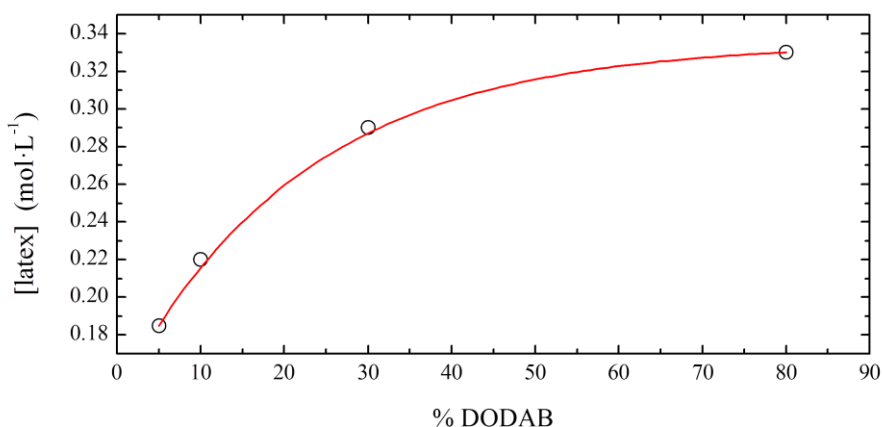


Figura 4.36 Variación de la concentración de látex necesaria para obtener el punto de neutralización con el % de DODAB que forma el sistema de liposomas DOPC:DODAB.

necesaria para neutralizar la carga de los liposomas. La tendencia de la curva se aproxima a una relación lineal con la densidad de carga propia de los sistemas recubiertos. Con estos resultados se puede calcular la concentración de partículas de látex necesaria para el recubrimiento de los liposomas con mayor exactitud.

Dispersión de rayos X (SAXS) y de neutrones (SANS)

La confirmación del tamaño medido por dispersión de luz se ha llevado a cabo mediante otras técnicas de dispersión pero con medidas desarrolladas a bajo ángulo. Una de ellas es dispersión de Rayos X (SAXS). SAXS permite la medición de soluciones que contengan partículas más pequeñas, incluidos los recubiertos, pero sin exceder el máximo permitido por la técnica (dependiente del vector de onda) para que la técnica pueda ser más exacta.

Las medidas de SAXS permiten realizar un análisis estructural incluida forma y tamaño de los materiales^[235]. El desarrollo del análisis de las funciones obtenidas mediante esta técnica permite obtener información muy valiosa de los sistemas estudiados. En la Figura 4.37 se muestra la función de correlación de la intensidad dispersada obtenida por el equipo de SAXS y considerando que los liposomas son esferas huecas. Ha habido varias

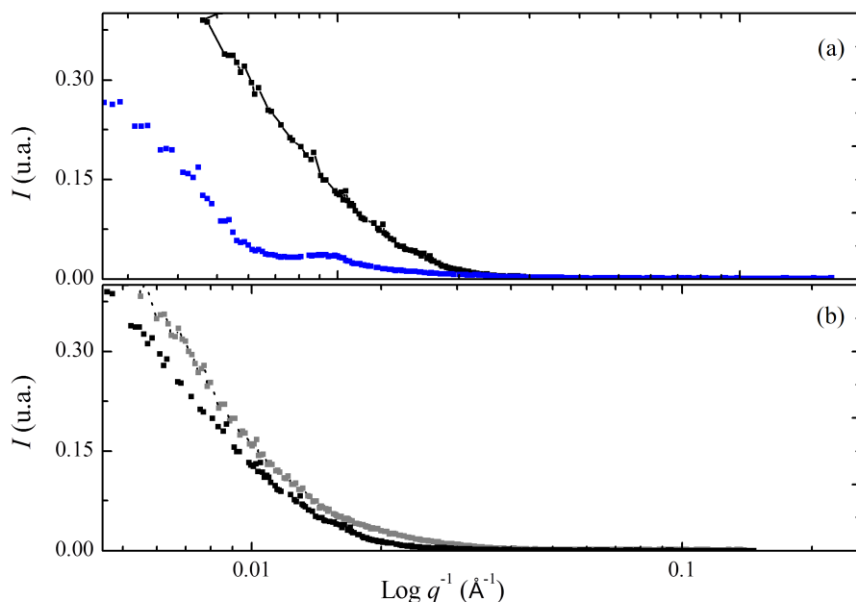


Figura 4.37 Variación de la intensidad dispersada por liposomas de 100 nm de diámetro con diferentes capas en disolución acuosa con una fuerza iónica de 10 mM NaCl medidos a 25°C. (a) Liposomas catiónicos formados por DOPC:DODAB (50:50) (■) y por (90:10) recubiertos con una capa de partículas de látex de 20 μm de diámetro (■); (b) DOPC:DODAB (6:4) recubiertos con una capa de poli-estiren sulfonato (PSS) (■) y DOPC:DODAB (50:50) (■).

consideraciones que han sido fijadas antes del desarrollo del experimento como son la densidad uniforme y la consideración de muestras diluidas.

Se observa que la intensidad dispersada va disminuyendo a medida que aumenta el vector de onda. Dado que en las funciones representadas no se observan picos durante la caída se confirma el modelo elegido de esfera hueca es el correcto, sólo en el caso de liposomas recubiertos con partículas de látex de 20 nm de diámetro aparece una variación de la función a valores de q bajos. Con la función de distribución espacial de la muestra dispersada se determina el diámetro máximo posible, y al mismo tiempo esta información puede cuantificarse para dar idea sobre la heterogeneidad del sistema. Pero para conocer estos valores es necesario aplicar un modelo que describa el sistema y cuya curva de dispersión coincida con la obtenida experimentalmente. El método de análisis utilizado es el denominado

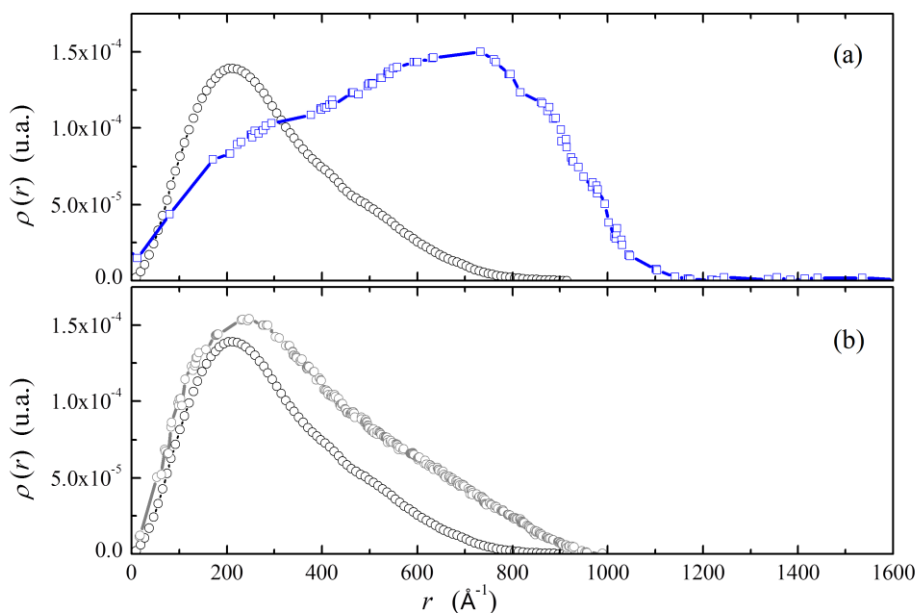


Figura 4.38 Función de distribución de densidad electrónica en función de la distancia máxima, d_{\max} , calculada a partir de los resultados SAXS para las muestras de liposomas de DOPC con DODAB en disolución acuosa y 10 mM NaCl donde se muestran: (a) DOPC:DODAB (50:50) (■) y por (90:10) recubiertos con una capa de partículas de látex de 20 μm de diámetro (■); (b) DOPC:DODAB (6:4) recubiertos con una capa de poli-estiren sulfonato (PSS) (■) y DOPC:DODAB (50:50) (■).

método bayesiano IFT (inverso de la transformada de Fourier). Los parámetros de análisis son los siguientes: temperatura de la muestra a 20°C y el tiempo de medida de $8 \cdot 10^4$ ms y quedan fijados para el cálculo automático que se realiza en el equipo. En la Figura 4.38 se representa la función de distribución de probabilidad del valor posible del tamaño del liposoma formado por extrusión y una vez aplicado este método de análisis.

La información obtenida de este estudio para las tres muestras analizadas se muestra en la Tabla 4.3 y corresponden a los valores del radio de giro, diámetro máximo e intensidad inicial.

Con estos resultados, el tamaño del liposoma obtenido, dentro del error experimental, se corresponde con los valores esperados, ya que la vesícula se ha extruido con membranas cuyo tamaño de poro es 100 nm. Al añadir un

Tabla 4.3 Radio de giro, Diámetro máximo e Intensidad inicial para muestras de liposomas en diolución acuosa con fuerza iónica de 10mM NaCl.

Nombre de muestra	R_g/nm	D_{max}/nm	I_o
DODAB:DOPC _{1:1}	23.83 ± 0.5	84 ± 5	0.617 ± 0.007
DODAB:DOPC _{1:9} -Látex	42.99 ± 0.2	119 ± 9	0.452 ± 0.002
DODAB:DOPC _{4:6} -PSS	28.8 ± 0.5	93 ± 4	1.01 ± 0.01

polielectrolito sobre la vesícula aumenta el valor del diámetro en 10 nm y al añadir partículas de látex el aumento del diámetro es de 20 nm, que corresponde exactamente con el diámetro de dichas partículas.

La forma de la curva de dispersión tiene dos zonas, aquella que se sitúa a valores bajos de q donde se aplica la Ley de Guinier y a valores altos de q en los que se aplica la Ley de Porod. Se van a obtener datos experimentales a bajos ángulos y así poder comparar con los proporcionados por el equipo.

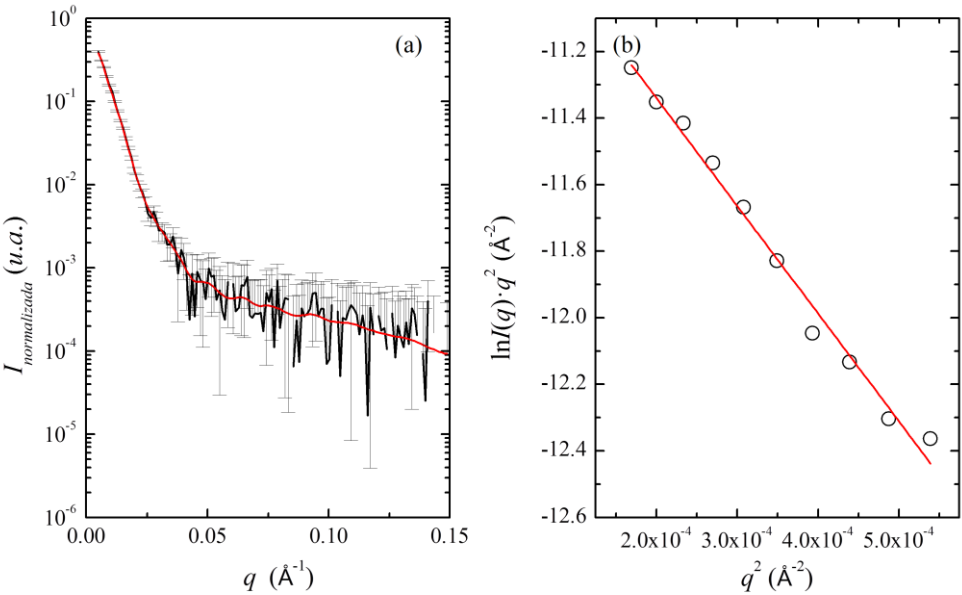


Figura 4.39 (a) Variación experimental de la intensidad con respecto al vector de onda. (b) Representación del cuadrado del vector de onda frente al logaritmo de la intensidad por el vector de onda. Aplicación de la ley de Guinier para vesículas DOPC:DODAB (50:50).

En la Figura 4.39 se muestran los valores experimentales obtenidos a 20°C para una disolución de liposomas formados por DOPC:DODAB (50:50) de 100 nm de diámetro. El intervalo de q seleccionado para aplicar la Ley de Guinier corresponde a valores de hasta 0.015 \AA^{-1} y se obtiene una línea recta con pendiente negativa. Esta linealidad indica que la consideración de muestras monodispersas de las disoluciones liposomares ha sido correcta.

A partir de la ecuación 2.30 se obtiene el valor del radio de giro que puede ser comparado con el resto de los sistemas. Una vez obtenido este valor se aplica la ecuación (4.2) válida para esferas (ya mostrada en el capítulo de **Técnicas experimentales**) y así poder conocer el espesor de la bicapa lipídica de los liposomas:

$$\left(R_g^2\right)^{1/2} = \sqrt{\frac{3}{5}}R \quad (4.3)$$

En la Figura 4.40 (a) se muestra el perfil de la densidad electrónica para el mismo sistema, es decir DOPC:DODAB (50:50) en función de la

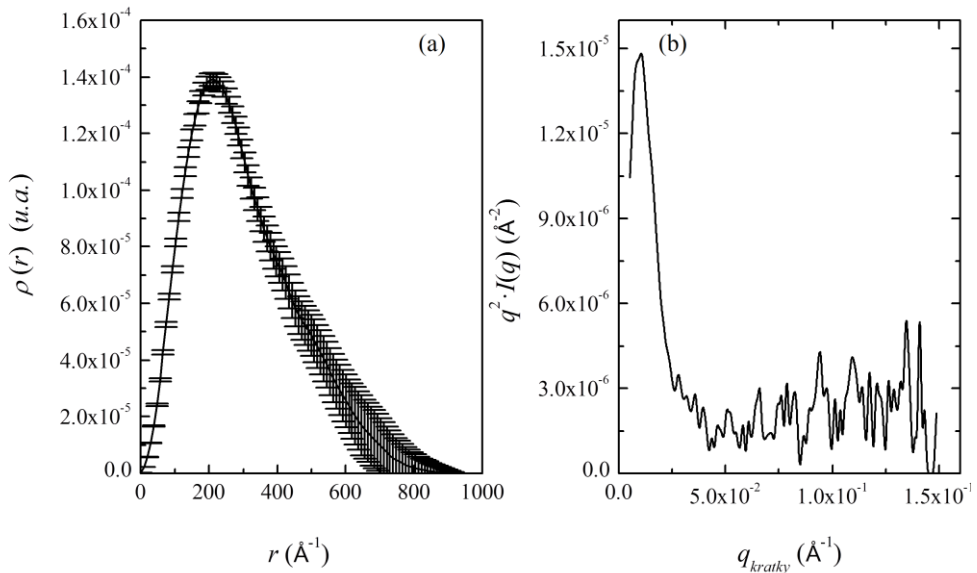


Figura 4.40 (a) Densidad electrónica en función de la distancia, r para vesículas DOPC:DODAB (50:50). (b) Representación de $I \cdot q^2$ frente a q .

Tabla 4.4 Radios obtenidos experimentalmente mediante dispersión de rayos X para liposomas con diferentes recubrimientos a 20°C.

Nombre de muestra	R_g /nm	Espesor /nm	R/nm
DODAB:DOPC_{1:1}	28.3±0.5	3.2± 0.5	36.5± 0.5
DODAB:DOPC_{1:9}-Látex	42.99±0.2	23.9± 0.2	55.5± 0.2
DODAB:DOPC_{4:6}-PSS	30.2±0.5	5.3 ± 0.5	38.9± 0.5

distancia r . Se observa una gaussiana que es característica de formas globulares como ya se explicó en el capítulo de **Técnicas experimentales** cuyo centro se corresponde con el valor de $D_{\max}/2$. El análisis de la conformación de los liposomas viene dado en la Figura 4.40 (b) en la que se muestra un análisis de los datos experimentales para conocer el tipo de plegamiento por la Ley de Kratky. Al representar $I \cdot q^2$ frente a q se puede observar un alto grado de organización del liposoma, las heterogeneidades presentes en la disolución son esféricas que para este tipo de estructuras está de acuerdo con la teoría. Con este procedimiento se calcularon para el resto de muestras y los valores obtenidos se presentan en la Tabla 4.4.

Otra técnica de bajo ángulo utilizada es SANS que utiliza un haz de neutrones para bombardear la muestra. El uso combinado de los rayos X y los neutrones utilizando diferentes mecanismos de contraste muestra más información sobre la estructura interna de los liposomas, consiguiendo descripción exhaustiva sobre morfología y forma que con técnicas basadas en dispersión de luz no se puede obtener.

Los experimentos con SANS fueron realizados con fuente de luz sincrotrón, de forma que así es posible obtener un haz monocromático bien colimado puntual e intenso, inmejorable para las medidas a bajos ángulos.

Los liposomas formados por fosfolípidos, los cuales a su vez poseen una parte polar con alta densidad electrónica, nos permite investigar la región hidrofílica del liposoma mediante dispersión de rayos X^[363], mientras que los neutrones son más sensibles al interior hidrofóbico. Para asegurarse unas medidas que proporcionen valores reales, se suprime la consideración de densidad electrónica uniforme utilizada para SAXS ya que en este caso se obtiene la curva de dispersión mediante la diferencia de densidades. Por ello, a la hora de preparar muestras para SANS se hace uso del contraste de los dispersantes utilizados que son agua deuterada y agua miliQ. Si no

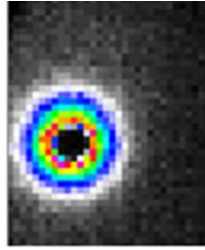


Figura 4.41 Fotografía del patrón de difracción de neutrones para vesículas obtenido con cámara del equipo de SANS en el LLB. Vesículas 30%DODAB-70%DOPC en disolución acuosa con una concentración de 10 mM NaCl.

existiera contraste no se produce dispersión alguna por la muestra o se produce con una intensidad muy pequeña imposible de analizar. Este contraste se forma con agua deuterada para producir un cambio isotrópico de composición sustituyendo protones por deuterones. El contraste puede ser maximizado en ciertas regiones que nos resulten de interés como puede ser la bicapa o el interior de la vesícula. Para las muestras de liposomas con recubrimiento se utilizan polielectrolitos deuterados, como es el caso de PSS_{deuterado} para que la sustitución de protones sólo se produzca en la parte exterior del liposoma y la estructura se puede modelizar como *multi-core-shell*.

En la Figura 4.41 se muestra la fotografía de una muestra de liposomas cuando el haz de neutrones incide sobre el liposoma. Los diferentes colores muestran el diferente patrón de difracción creado en función de la naturaleza del liposoma.

En ambas experiencias, las muestras se midieron a una longitud de onda que depende de la distancia a los detectores. La distancia a los detectores fue de 4.5 m para una longitud de onda de 12 Å y de 1 m para una longitud de onda de 6 Å.

La densidad de longitud de dispersión de neutrones (SLD) se define como:

$$SLD = \frac{\sum_{i=1}^n b_c}{V_m} = \sum_{i=1}^n b_i \cdot \rho \cdot \frac{N_A}{M_w} \quad (4.4)$$

donde b_c es la longitud de dispersión coherente de n átomos que forman una molécula en un volumen molecular dado (V_m).

Para el caso de H_2O

$$(2 \times (-0.374) + 1 \times (0.581)) \times 10^{-12} \times 1 \frac{g}{mol} \frac{N_A}{18} = -0.56 \cdot 10^{-10} cm^{-2}$$

Para el caso del agua deuterada:

$$(2 \times (0.6674) + 1 \times (0.5805)) \times 10^{-12} \times 1.1 g \cdot mol^{-1} \cdot N_A \cdot 20^{-1} = 6.34 \cdot 10^{-10} cm^{-2}$$

Para el fosfolípido se calcula de la misma forma. Los valores de las longitudes de dispersión están tabulados para los átomos por lo que no es difícil el acceso a ellos (Tabla 4.5).

Para calcular el contraste obtenido cuando se realiza la disolución de los liposomas y se calcula por ello en función de la cantidad de la relación en la que se añadieron. En nuestro caso la relación es 91:9 por lo que el SLD de la mezcla

$$\rho_{mezcla} = \rho_{liposoma} - \rho_{D_2O}$$

El contraste es simplemente la diferencia entre la parte de la muestra de interés, el liposoma, y los alrededores, el medio. Por ejemplo en el estudio de capas adsorbidas es bastante común un contraste del sustrato con el medio, al mezclar formas hidrogenadas y deuteradas del medio en apropiada proporción para que se pueda observar tan solo la dispersión debida a las capas adsorbidas. Las mezclas se calculan con la ecuación que hace media entre los valores de SLD de cada uno de los lípidos.

Tabla 4.5 Datos principales de los compuestos utilizados en SANS

Muestra	Fórmula molecular	M_w (g/mol)	b_l (fm)	V (\AA^3)	SLD (fm/ \AA^3)
D₂O	D ₂ O	20	19.15	29.29	0.64
H₂O	H ₂ O	18	-1.68	30	-0.056
DOPC	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	786.13	39.22	1303	0.03
DODAB	C ₃₈ H ₈₀ B _r N	630.95	-30.49	1106	-0.34
PSS	(C ₈ H ₇ NaO ₃ S) _n	70000	65.86	153.2	0.43
PAH	(CH ₂ CH(CH ₂ NH ₂)) _n	17000	3.12	7	0.45
PSSd	(C ₈ D ₇ NaO ₃ S) _n	55000	123.79	200	0.62

$$\rho_{mezcla} = \chi_{DOPC} \cdot (\rho_{DOPC}) + (1 - \chi_{DOPC}) \cdot \rho_{DODAB}$$

Se realiza el mismo cálculo para el par de polielectrolitos y la mezcla de agua, de tal forma que se obtiene $\rho_{PSS/PAH} = 2.90 \pm 0.15 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$; para la mezcla de agua miliQ y agua deuterada 91:9, $\rho_{H_2O/D_2O} = 1.13 \pm 0.2 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Finalmente para los liposomas formados por DOPC y DODAB en una relación 50:50 $\rho_{DOPC/DODAB} = 11.3 \pm 0.02 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$. Para las medidas realizadas se obtiene el contraste igual a $\Delta\rho = \rho_{liposoma} - \rho_{disolvente} - \rho_{PSS/PAH} = 7.27 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$.

El modelo utilizado para el ajuste de los datos obtenidos directamente del equipo es el modelo de esfera hueca y de esta forma se obtuvieron los parámetros propios proporcionados por el mismo. En la Figura 4.42 se representa los valores obtenidos para algunas muestras formadas por fosfolípidos. En este caso se compara el liposoma sin recubrimiento y con dos bicapas para que con el mismo contraste se determinen las diferencias debido a la adsorción de polielectrolitos en la superficie del liposoma.

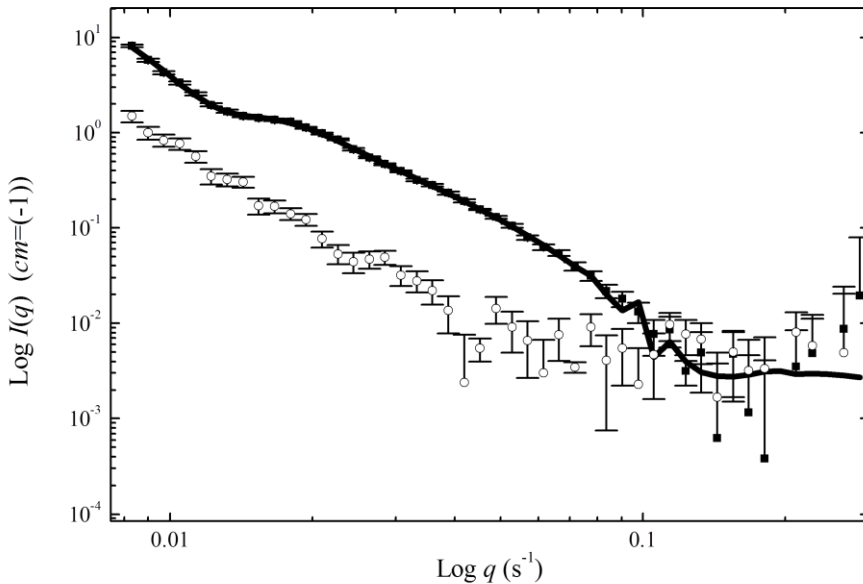


Figura 4.42 Variación de la intensidad dispersada con el vector de onda en escala logarítmica. Resultados de neutrones para vesículas sin recubrimiento (■) y vesículas con dos bicapas (□).

Tabla 4.6 Radios obtenidos para liposomas con diferentes recubrimientos

Muestra	$R_{\text{SANS}} / \text{nm}$	Condiciones de contraste $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$
DOPC:DODAB (liposoma,L)	47.86	91:9
L-(PSS/PAH)	49.56	91:9
L-(PSS/PAH)-PSS _{deuterado} - (PSS/PAH)	61.4	91:9
L-(PSS/PAH) ₂ -PSS _{deuterado} - (PSS/PAH)	78.56	91:9
L-(part. Poliestireno)-PAH	77.85	91:9

En la Tabla 4.6 se muestran los radios calculados para algunas muestras analizadas. Se observa un aumento en el radio exterior, proporcional al número de capas y ha sido posible gracias a los contrastes realizados con

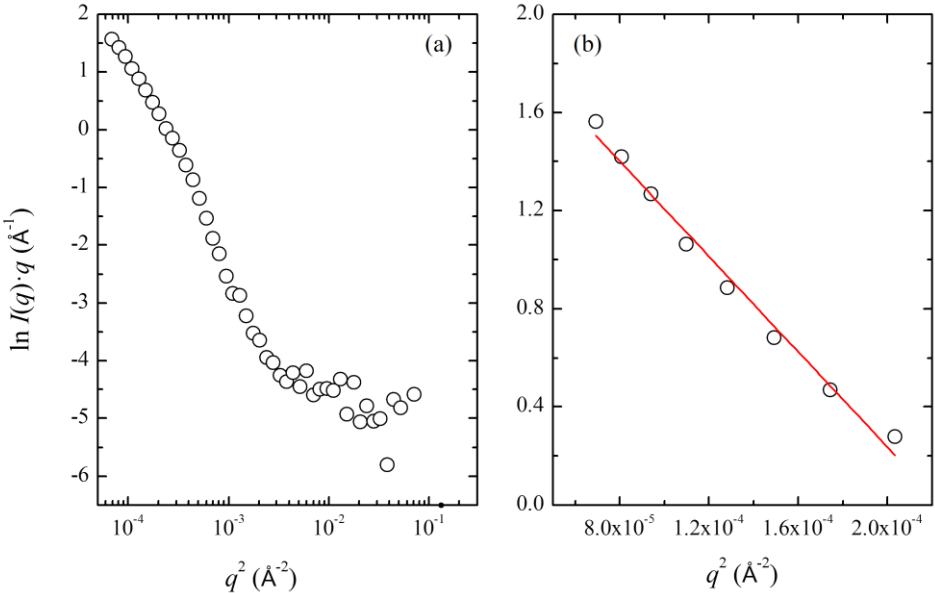


Figura 4.43 (a) Variación de la Intensidad dispersada por neutrones por el vector de onda en función del cuadrado del vector de onda, $\ln[I(q)]\cdot q$ frente a q^2 (b) Misma representación pero en el intervalo seleccionado, en el que se aplica la Ley de Guinier y obtener el radio de giro en vesículas recubiertas con (Látex/PAH).

Tabla 4.7 Radios obtenidos experimentalmente para liposomas con diferentes recubrimientos aplicando la Ley de Guinier

Muestra	$R_{\text{SANS}} / \text{nm}$	Espesor $_{\text{SANS}} / \text{nm}$
DOPC:DODAB (liposoma,L)	56.6	4.4
L-(PSS/PAH)	71.80	14.7
L-(PSS/PAH)-PSS _{deuterado} -(PSS/PAH)	84.70	28.3
L-(PSS/PAH) ₂ -PSS _{deuterado} -(PSS/PAH)	88.28	31.6
L-(part. Poliestireno)-PAH	79.13	22.5

agua deuterada y PSS deuterado.

Los datos experimentales pueden ser evaluados usando la aproximación de Kratky-Porod. Se representa $\ln[I(q)]$ frente a q^2 donde $I(q)$ es la intensidad SANS y así obtener el radio de giro de la bicapa^[364]. El espesor fue calculado a partir de R_g extrapolado en la Figura 4.43 (a), para dilución infinita con la aplicación de la ley de Guinier a bajo ángulo y que a modo de ejemplo se muestra en la Figura 4.43. De la Figura 4.43 (a) se selecciona la parte de la curva a $q \sim 0.015 \text{ nm}^{-1}$, donde se obtiene una recta y es de ahí de donde se extrae el valor del radio de giro para todas las muestras. Con este valor se calcula, por tanto, el radio de los liposomas con y sin recubrimiento. En la Tabla 4.7 se presentan los radios obtenidos experimentalmente.

Finalmente la Tabla 4.8 muestra una comparación de los valores de radios obtenidos hasta ahora para este tipo de liposoma catiónico con las diferentes técnicas utilizadas de dispersión y de microscopía. Los resultados indican que las técnicas de dispersión son el método conveniente para determinar el tamaño para el caso de disoluciones de liposomas monodispersos. La combinación de dispersión de luz, dispersión de rayos X y dispersión de neutrones cubren así un amplio rango de longitudes de onda

Tabla 4.8 Radios obtenidos experimentalmente para liposomas con diferentes recubrimientos utilizando distintas técnicas

Muestra	$R_{\text{DLS}} (\text{nm})$	$R_{\text{SANS}} (\text{nm})$	$R_{\text{SAXS}} (\text{nm})$	$R_{\text{crio-TEM}} (\text{nm})$	$R_{\text{crio-SEM}} (\text{nm})$
DOPC:DODAB (liposoma,L)	48.5	47.86	42.0	38.0	60.0

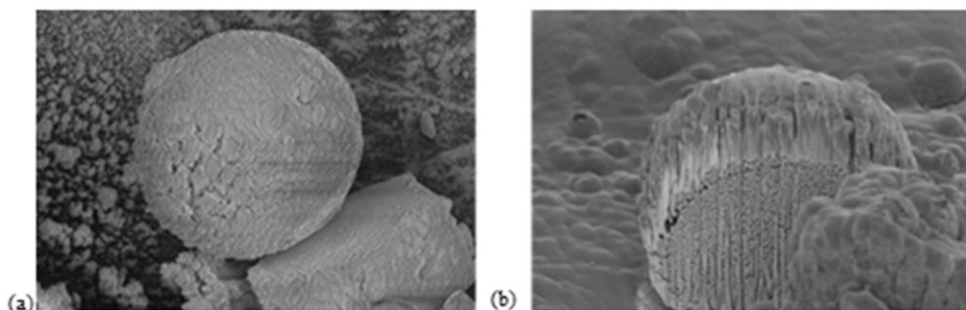


Figura 4.44 (a) Imagen de FIB de partículas de poliestireno de $3\mu\text{m}$ recubiertas con liposomas de 100 nm. La adsorción de los liposomas sobre estas partículas se ha realizado mediante la técnica capa a capa por interacciones electrostáticas. (b) Corte del sistema obtenido con FIB.

que permite caracterizar propiamente estos sistemas de tamaño nanoscópico. Por su parte, la microscopía aporta otro tipo de detalles como son la morfología y estructura interna del liposoma, además del radio convirtiéndose en técnicas complementarias a la hora de describir un sistema.

Con esta técnica queda mucho trabajo, siendo esto el principio para seguir optimizando en las medidas de liposomas que se han de realizar y así permitir que sea una técnica más en la caracterización de los liposomas. Un experimento que se llevó a cabo con éxito es el que se muestra a continuación. En la Figura 4.44 se observa el sistema formado por partículas de látex cuya superficie se encuentra recubierta por liposomas de 100 nm.

En la Figura 4.44 (a) se observan los liposomas alrededor de la partícula obtenido con FIB y esta misma muestra en la que se aplica un corte aproximadamente de la mitad de la partícula para observar cómo se estructuran los liposomas sobre la partícula (Figura 4.44 (b)). A pesar de haberse producido fusión de la partícula, es posible observar que parte de los liposomas adsorbidos permanecen intactos sobre la partícula, algunos de ellos deformados, lo cual es debido al proceso de optimización de espacio que tiene lugar cuando los liposomas entran en contacto con una superficie.

Con la información proporcionada con esta técnica y combinado con SEM podemos confirmar con mayor exactitud el tamaño y la polidispersidad de los liposomas obtenidos por extrusión además de conocer la forma que algunos liposomas adoptan cuando entran en contacto con otras superficies.

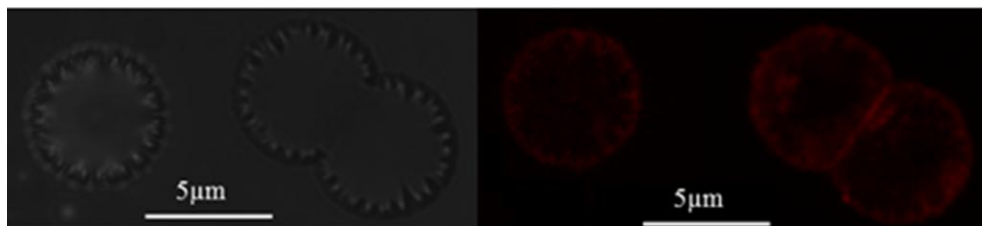


Figura 4.45 CLSM: Partículas de látex recubiertas de liposomas de 1 μm con *Quantum Dots* en la bicapa lipídica.

Estos sistemas se han caracterizado con microscopía de confocal, de tal forma que los liposomas son observados cuando quedan adsorbidos sobre las partículas de poliestireno. Se fabricaron liposomas con Quantum Dots depositados en la bicapa lipídica durante la etapa de la formación de la misma. Después de la etapa de extrusión, la dispersión se centrifuga para eliminar el exceso que no forma parte de los liposomas y que está libre en la disolución. El objeto de añadir Quantum Dots como marcador fluorescente en las vesículas fue la observación de liposomas con un tamaño tan pequeño que no es posible observarlo con una microscopía convencional y tan solo es posible con CLSM. Es por ello, por lo que una vez fabricados se adsorben sobre la superficie de partículas de látex por interacciones electrostáticas. En la Figura 4.45 se muestran las imágenes de partículas de látex de 3 μm con una capa de liposomas de 100 nm de diámetro adsorbida por interacciones electrostáticas a pH 7.4 en disolución tampón y con una fuerza iónica de 10 mM. Se observó que los liposomas quedan intactos, deformándose un poco para poder conseguir una capa homogénea alrededor de la partícula.

4.1.4 Adsorción alternada capa a capa de sistema PGA/PLL

Liposomas formados por DOPC y DODAB

Siguiendo con el estudio detallado de la adsorción capa a capa de polielectrolitos sobre liposomas como plantilla, se va a describir en detalle el sistema formado por liposomas formados por la mezcla DOPC:DODAB (30:70), elegido tras los previos resultados de estabilidad obtenidos anteriormente y el par de polielectrolitos biocompatibles PGA/PLL. La elección de este nuevo sistema busca que este estudio se acerque más al campo de los bio-materiales. Las técnicas que se utilizan son dispersión de luz y potencial zeta.

En la Figura 4.46 se muestra la variación del radio hidrodinámico cuando se adsorbe un polielectrolito. Se comienza con PGA y se continúa con PLL, son polielectrolitos dependientes del pH, por lo que para mantener el pH siempre constante se trabajará en disoluciones tamponadas. El espesor en

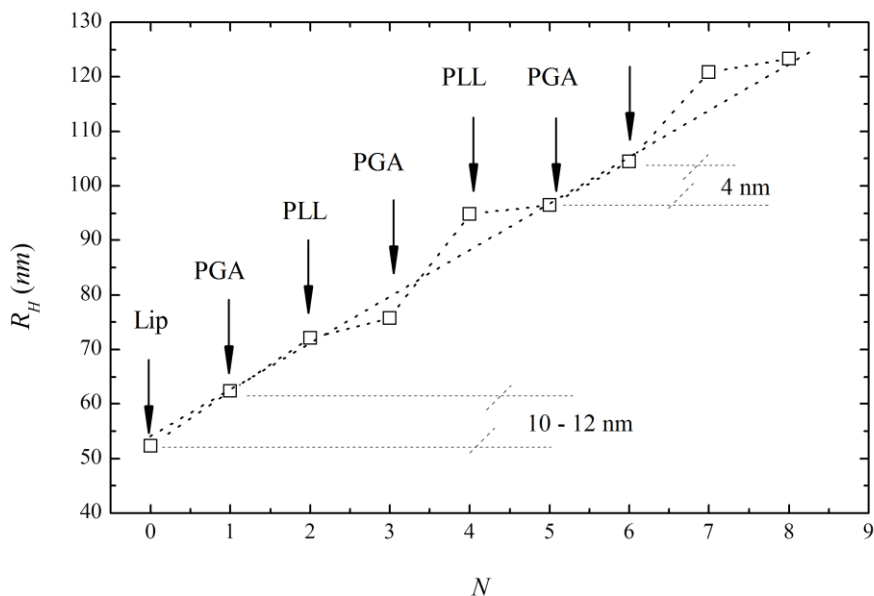


Figura 4.46 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas catiónicas DOPC:DODAB (70:30) en tampón HEPES pH 7.4 medidas a 25°C.

este caso para PGA es de 10-12 nm y para PLL de 4 nm dentro de los errores experimentales, la tendencia de crecimiento se reproduce para todos los pares de polielectrolitos estudiados para este tipo de liposomas.

En la Figura 4.47 se observa la inversión de carga en cada capa para vesículas formadas por la mezcla de DOPC:DODAB (30:70). En este caso también, como cabe esperar, se produce el efecto par-impar de las capas. Aunque en la primera capa la carga negativa obtenida sea mayor, en el resto de las capas los valores positivos y negativos de la densidad de carga en función del polielectrolito adsorbido son los mismos, e independiente del sustrato.

Liposomas de carácter zwitteriónico formados por DOPC

En este punto se continúa con el par de polielectrolitos PGA/PLL y la diferencia es el tipo de liposoma utilizado, que está formado por DOPC puro confiriendo al liposoma carga dependiente del pH. Con este tipo de liposomas se quiere estudiar si la flexibilidad del mismo afecta al patrón de

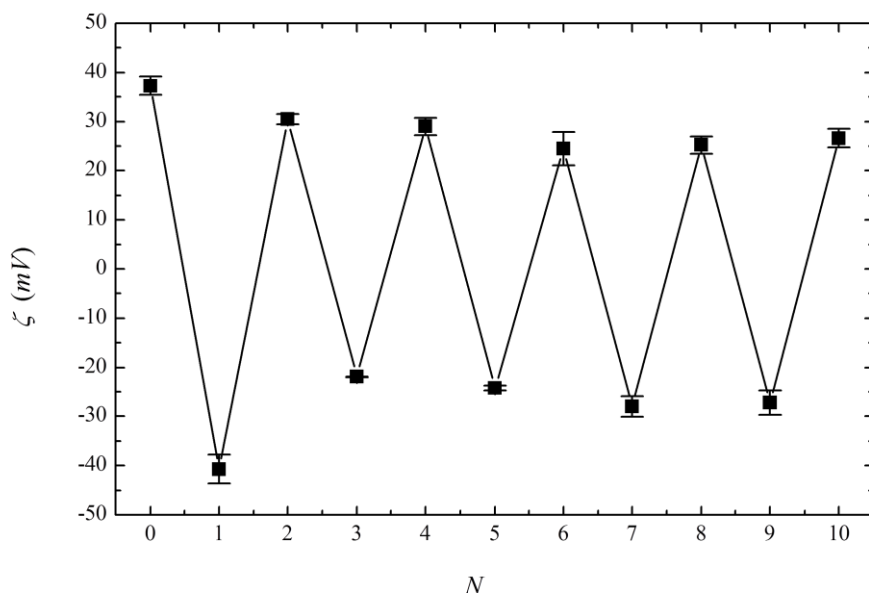


Figura 4.47 Variación del potencial zeta para vesículas formadas por DODAB en relación a DOPC (3:1) recubiertas con el par de polielectrolitos PGA/PLL en disolución tampón a pH 7.4.

adsorción de los polielectrolitos sobre la vesícula.

La Figura 4.48 muestra la variación del radio hidrodinámico con el número de capas. Los dos sistemas representados difieren en la primera capa adsorbida sobre los liposomas con el objetivo de optimizar uno de ellos. El PEI actúa como un pegamento que produce más compactación de las cadenas poliméricas que se adsorben posteriormente, y la adsorción de agua entre dichas capas será menor en los sistemas que no están formados por PEI. En ambos casos se produce un aumento en el espesor debido al recubrimiento pero para el sistema de PLL/PGA, el aumento del espesor es mayor. Si se compara el tamaño de los liposomas recubiertos con cuatro capas, el sistema con PLL/PGA llega a tener 30 nm más de tamaño que el sistema con PEI/PGA/PLL.

El cálculo del punto de neutralización para el recubrimiento con PLL y con PGA como segunda capa se muestra en la Figura 4.49.

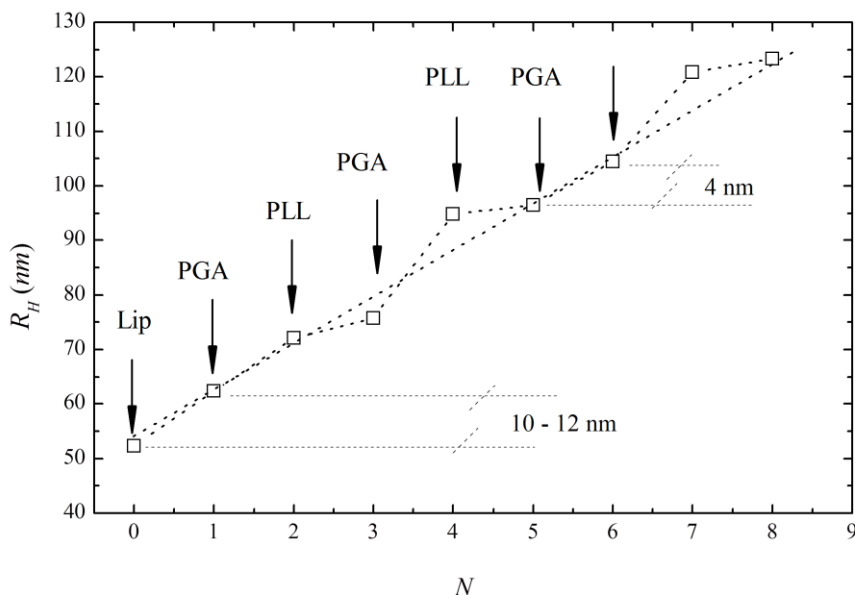


Figura 4.48 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas zwitteriónicas formadas por DOPC en tampón HEPES pH 7.4 medidas a 25°C.

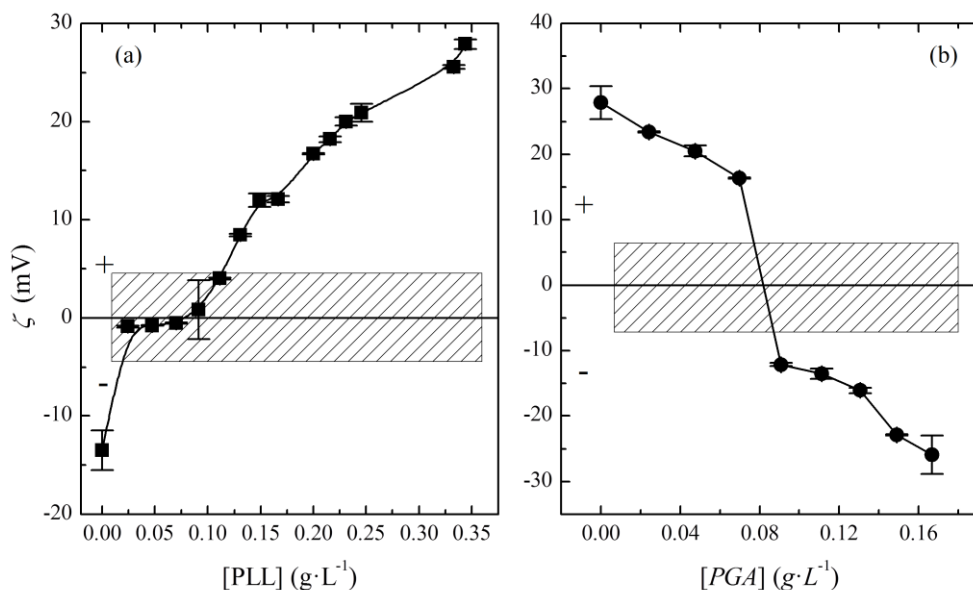


Figura 4.49 (a) Variación del potencial con la concentración de PLL añadido a la disolución tamponada a pH 7.4 de liposomas formados por DOPC y (b) Variación del potencial con la concentración de PGA añadido a la disolución tamponada a pH 7.4 de liposomas formados por DOPC

El primer recubrimiento de la vesícula es el que mayor influencia tiene de la misma. Se comienza con una carga negativa muy débil debida al liposoma zwitteriónico y al final del recubrimiento se obtiene una carga positiva bastante más alta correspondiente a casi 30 mV, debido al PLL mostrando así una mejora de la estabilidad del sistema. En la Figura 4.49 (b) se muestra el recubrimiento con una segunda capa de polielectrolito del liposoma zwitteriónico formado por DOPC. El polielectrolito adsorbido mediante interacciones electrostáticas es PGA y los resultados de inversión de carga tras una primera capa de polielectrolito de carga contraria serán independientes de la plantilla y los resultados mostrarán un sistema con mayor estabilidad debido a que la carga obtenida es bastante alta, si se compara con la carga inicial del liposoma.

Se muestra a continuación el sistema estudiado con el mismo tipo de liposomas, formados por DOPC, pero en este caso la primera capa adsorbida es de PEI. En la Figura 4.50 (a) se observa la inversión de carga una vez recubierto el liposoma con PEI, incrementando su estabilidad al alcanzar valores de carga altos. Tras la adsorción del PEI, el polielectrolito adsorbido es PGA con el objeto de poder comparar con el anterior sistema en el que se estudiaron el par de polielectrolitos PGA/PLL. En la Figura 4.50 (b) se muestra la inversión de carga a medida que se añade más cantidad de PGA hasta que finalmente se obtiene la inversión de carga. De nuevo, los valores alcanzados son mucho más altos que antes de la adsorción de los polielectrolitos y por tanto mayor estabilidad.

En la Figura 4.51 se muestra la variación del potencial zeta con el número de capas. El liposoma estudiado está formado por DOPC puro que a pH 7.4 adquiere carga negativa y sobre el que se han depositado inicialmente PLL en un caso y PEI en el otro como primera capa, pero el estudio en ambos sistemas continúa con el par de polielectrolitos PGA/PLL.

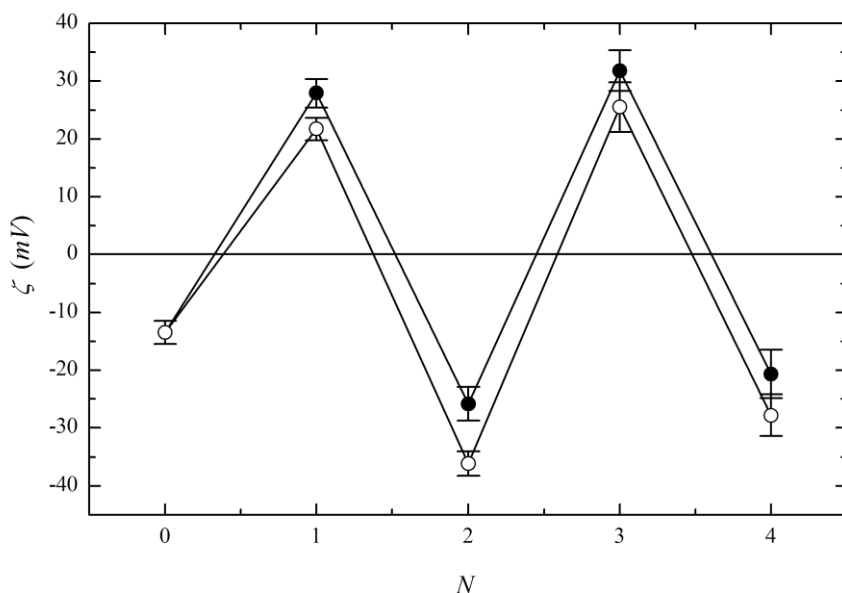


Figura 4.51 Evolución del potencial zeta en función del número de capas para liposomas zwiteriónicos como el formado por DOPC para sistemas con los pares polielectrolitos PLL/PGA (●) y PEI/PGA/PLL (○)

Para ambos casos, el potencial zeta ξ sigue la misma tendencia en los valores, positivo cuando el polielectrolito es positivo y negativo cuando el polielectrolito es aniónico. Al adsorber PEI inicialmente sobre el liposoma, la carga adquirida es menor que si se adsorbe PLL y a medida que se adsorben la secuencia de polielectrolitos, la carga que adquiere el sistema de PEI-(PGA-PLL)_n va a tener un valor de carga menor.

4.1.5 Liposomas recubiertos con cadenas de polietilenglicol (PEG)

Una alternativa elegida ha sido el recubrimiento de liposomas a partir de fosfolípidos modificados con cadenas poliméricas de PEG y que al formar el liposomas por extrusión, las cadenas recubren a los liposomas y se sitúan tanto dentro del mismo como fuera. Se va a estudiar cómo afectan estas cadenas a la estabilidad y a la polidispersidad del sistema y para ello el liposoma se va a modificar con varias proporciones de este lípido. A su vez se va a estudiar con lípidos modificados con PEG de diferente peso

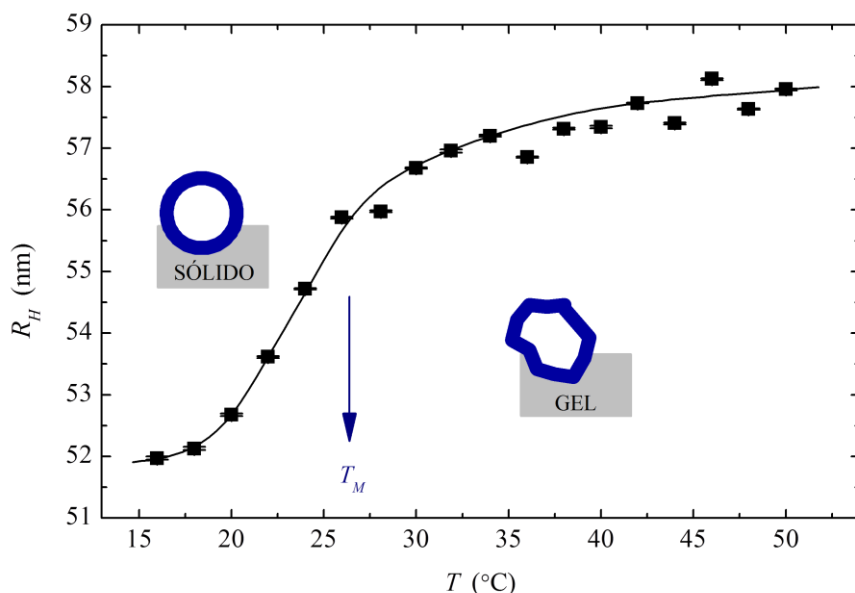


Figura 4.52 Variación del radio hidrodinámico en función de la temperatura para liposomas formados por DMPC y de tamaño 100 nm.

molecular porque el tamaño de estas cadenas también influye en el comportamiento del liposoma. Se ha estudiado la evolución del radio hidrodinámico cuando la temperatura varía. El intervalo elegido ha sido una temperatura menor a la temperatura de transición, asegurando el estado sólido del lípido hasta una temperatura muy superior a la temperatura de transición para que el estado sea de gel, como se muestra en la Figura 4.52.

En la Figura 4.53 se muestra la variación del radio hidrodinámico con la temperatura para todos los sistemas estudiados con este tipo de lípidos. Es el sistema formado por DMPC el que muestra mayor variación del tamaño con la temperatura.

Cuando el liposoma queda recubierto por cadenas de PEG, la densidad de carga aparente disminuye debido a la estabilidad estérica a la que da lugar.

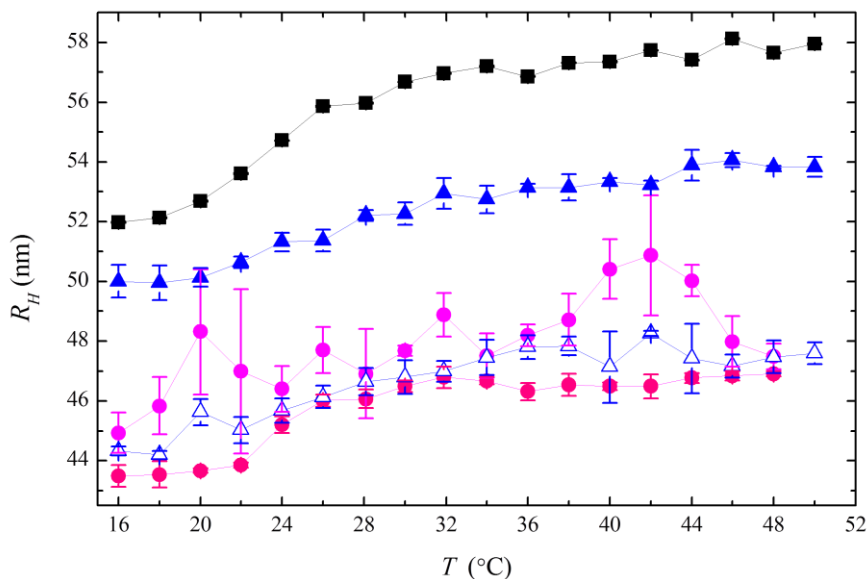


Figura 4.53 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para todos los sistemas liposomales formados por DMPC y DMPE-PEG medidos en disolución tamponada con una fuerza iónica igual a 10mM y pH7.4 donde (■) son liposomas formados por DMPC puro, (●) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₁₀₀₀ (96:4), (○) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₁₀₀₀ (92:8), (▲) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₅₀₀₀ (96:4), y finalmente (△) que son los formados por DMPC:DMPE_PEG₅₀₀₀ (92:8).

De esta forma aunque se varíen parámetros como pH, la densidad de carga prácticamente es constante, observando una variación de carga menor (prácticamente cero en todos los intervalos de pH) de la observada para liposomas sin recubrir.

El parámetro utilizado para medir la densidad de la carga es el potencial zeta ζ . El potencial zeta ζ es sensible a las transiciones de fase de los lípidos, a la adsorción de polímeros, proteínas, a la estabilización estérica con PEG y a las modificaciones superficiales en general. La concentración de cadenas de PEG en los liposomas debe ser optimizada, lo suficiente para recubrir al liposoma.

En la Figura 4.54 se observa la variación del punto isoeléctrico al mezclar un fosfolípido zwiteriónico, DMPC, y un fosfolípido con cadenas de PEG de diferente peso molecular, 5000 y 1000 Da. La mayor variación observada es cuando se combina con PEG de mayor peso molecular, 5000, en los que el punto isoeléctrico se reduce drásticamente hasta pH bajo y con

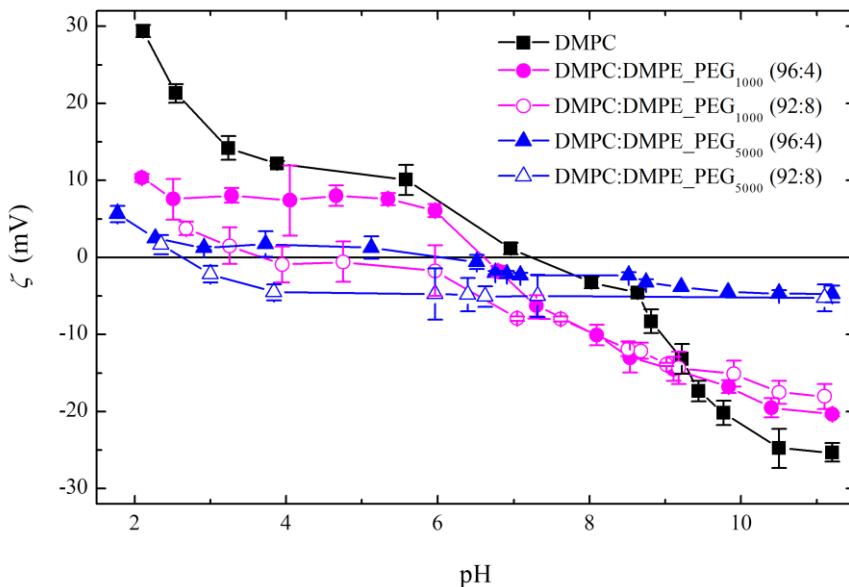


Figura 4.54 Variación del potencial zeta con el pH para liposomas zwiteriónicos formados por DMPC, y DMPC:DMPE_PEG. Las cadenas de PEG estudiadas son dos, con distinto peso molecular, por lo que se estudiaron dos ratios para cada uno de los PEG utilizados que permitan ser separados.

Tabla 4.9 Valores del punto isoeléctrico para liposomas de 100 nm en disolución salina de 10 mM formado por DMPC y DMPE modificado con cadenas de PEG de distinto peso molecular

Muestra	Relación molar	IEP±0.2
DMPC	1	7.2
DMPC:DMPE-PEG₁₀₀₀	96:4	6.6
DMPC:DMPE-PEG₁₀₀₀	92:8	3.7
DMPC:DMPE-PEG₅₀₀₀	96:4	6.1
DMPC:DMPE-PEG₅₀₀₀	92:8	2.6

una densidad de carga prácticamente nula. Esto implica que a pesar de disminuir el punto isoeléctrico para observar mayor estabilidad a pH fisiológico, los sistemas no son estables en todo el intervalo de pH. De forma general, la preparación de liposomas sin carga y recubiertos con polímeros hidrofílicos no iónicos como el polietilenglicol (PEG) produce sistemas más estables que muestran menor número de interacciones no específicas y de agregación, debido a que las barreras estéricas previenen la proximidad y el contacto^[66]. Liposomas recubiertos con cadenas de PEG de bajo peso molecular dan lugar a sistemas más estables, con suficiente densidad de carga y con la región inestable alejada de la región de trabajo.

Con la Tabla 4.9 se confirma la teoría expuesta en el párrafo anterior. De forma general, para estas relaciones, el sistema más interesante para desarrollar aplicaciones es el formado por PEG₁₀₀₀, cuyo punto isoeléctrico se sitúa justo por debajo del pH fisiológico que además ha demostrado mayor estabilidad con el tiempo, tal y como se muestra más adelante.

Ensayo enzimático

Se ha realizado la encapsulación de una enzima en el interior del liposoma, β -lactamasa que dado su pequeño peso molecular se esperaba que no afectara al punto isoeléctrico del sistema y es lo que se ha demostrado tras variar el pH de la disolución. El punto isoeléctrico se sitúa en 3.9 ± 0.2 y se observa en la Figura 4.55 (a). Por ello, la estabilidad del sistema está asegurada ya que se trabaja a un pH muy por encima del punto isoeléctrico.

El estudio de la variación del tamaño y del potencial zeta con la temperatura se muestra en la Figura 4.55 (b). Se observa que a temperatura por debajo de la temperatura de transición ambos parámetros aumentan

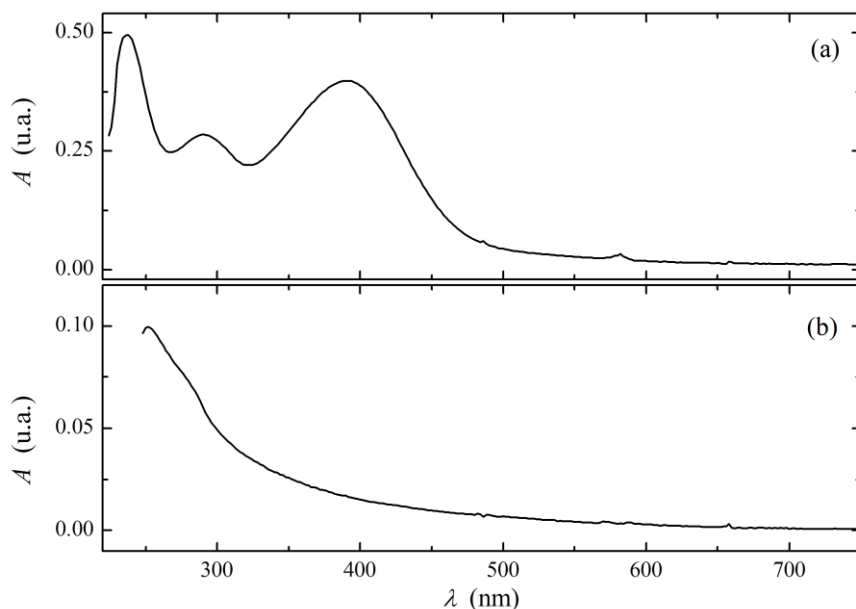


Figura 4.56 (a) Absorbancia frente a longitud de onda para la nitrocefina. (b) Absorbancia frente a longitud de onda para los liposomas obtenidos de DMPC y un 1.7% de PEG₁₀₀₀ con β -lactamasa en su interior.

aunque no de forma significativa. Una vez alcanzada aproximadamente la temperatura de transición (aproximadamente 20-22°C) los valores del tamaño y potencial zeta permanecen constantes, independientes de la temperatura hasta que se alcanza la temperatura de 40°C, y a partir de aquí se obtienen de nuevo los valores iniciales de estos dos parámetros.

Para hacer un seguimiento de la reacción que tiene lugar entre la β -lactamasa y la nitrocefina, se han hecho medidas con un espectrofotómetro de manera que los espectros obtenidos en el tiempo, a medida que transcurría la reacción. Como se ve en la Figura 4.56 (a) a medida que aumenta el tiempo, la banda característica de la nitrocefina que aparece a 392 nm, disminuye y va aumentando una banda a 492 nm correspondiente al producto hidrolizado de la reacción. Esto nos conduce a pensar que se está produciendo la liberación del fármaco encapsulado. Cuando la liberación del fármaco encapsulado se provoca con la adición de TRITÓN-X a la muestra, el espectro que se obtiene es el que se muestra en la Figura 4.56 (b), donde se comprueba que la banda a 392 nm ha desaparecido y aparece una banda correspondiente a la absorción del surfactante a 275 nm.

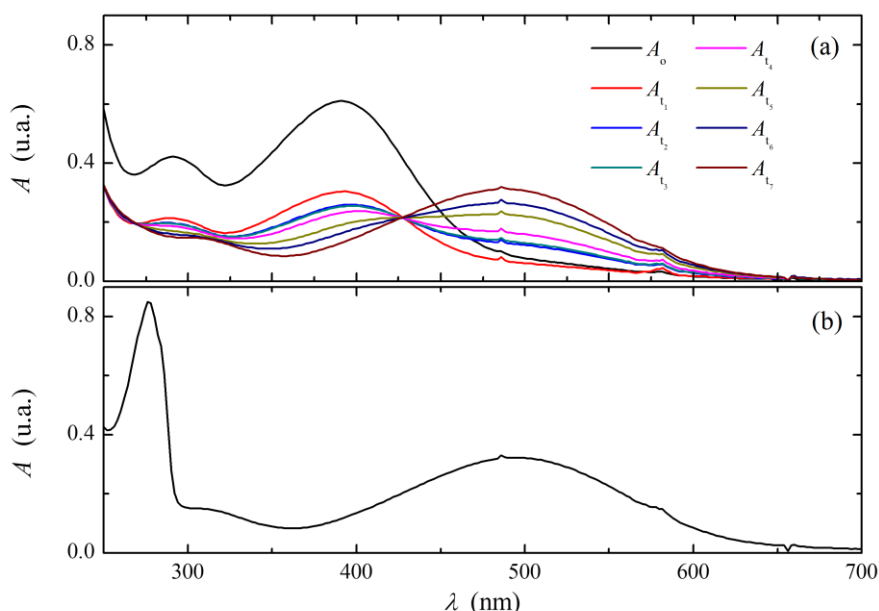


Figura 4.57 (a) Variación del espectro de absorción a medida que transcurre la reacción. El subíndice 0 indica el tiempo antes de añadir el sustrato y cada una de las medidas posteriores se realizaron cada cinco minutos una vez añadido el sustrato y agitado la mezcla.. (b) Espectro obtenido después de añadir TRITON-X100 medido a temperatura ambiente, 25°C. En la disolución está la enzima, el sustrato, el surfactante y la disolución de liposomas DMPC:DMPR_PEG.

La Figura 4.57 muestra cómo varía el espectro de absorción de la muestra a medida que se añade la nitrocefina y la muestra es calentada por encima de la temperatura de transición del lípido. La disolución de liposomas se ve afectado por la temperatura provocando que la carga encapsulada por los liposomas, en este caso la enzima, se libere.

En la Figura 4.58 se ha representado la absorbancia frente al tiempo a una longitud de onda de 492 nm para el caso de la muestra dializada a la que se le añadió nitrocefina, la muestra dializada añadiéndole nitrocefina y TRITÓN-X y para la muestra sin dializar a la que también se le añadió nitrocefina.

Haciendo un análisis cualitativo de los resultados obtenidos, se puede concluir que cuando la muestra no se somete al proceso de diálisis, la

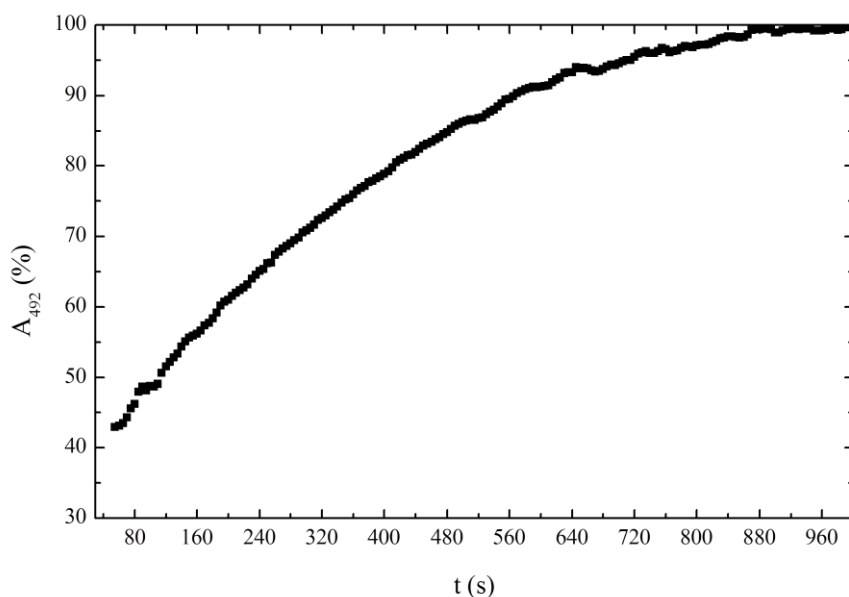


Figura 4.58 Representación de la variación de la absorbancia frente al tiempo.

cantidad de enzima que presenta es mucho mayor que cuando se dializa. Por eso mismo la velocidad de la reacción es mucho mayor en el caso de la muestra que no se ha dializado con respecto a las que sí se dializaron, por lo que el cambio de color de la muestra se produce prácticamente nada más añadir nitrocefina. El estudio realizado para la muestra dializada, se ha realizado a una temperatura superior a la temperatura de transición del lípido ($T^a=25.0^{\circ}\text{C}$). Esto hace que la enzima encapsulada se libere y reaccione con la nitrocefina. Para comprobar que efectivamente se ha liberado el fármaco, se ha repetido el estudio añadiendo TRITÓN-X. Las velocidades obtenidas son prácticamente las mismas que antes de esta adicción, hecho que nos confirma que por encima de la temperatura de transición de fase se produce la liberación de la totalidad de la enzima encapsulada.

El estudio con el tiempo para confirmar algún dato sobre su estabilidad ha sido desarrollado midiendo el tamaño de los sistemas, de forma que los resultados se muestran en la Tabla 4.10 donde se observa el índice de polidispersidad (PDI) para cada una de las muestras:

Tabla 4.10 Valores del PDI para liposomas de 100 nm en disolución salina de 10 mM formado por DMPC y DMPE modificado con cadenas de PEG de distinto peso molecular

Muestra	Relación molar	PDI _{inicial}	PDI _{1día}	PDI _{7días}	PDI _{14días}	PDI _{30días}	PDI _{60días}
DMPC	1	0.071	0.079	0.093	0.095		
DMPC:DMPE-PEG ₁₀₀₀	96:4	0.113		0.123		0.132	0.175
DMPC:DMPE-PEG ₁₀₀₀	92:8	0.104		0.110	0.117	0.171	
DMPC:DMPE-PEG ₅₀₀₀	96:4	0.089		0.094	0.120	0.121	
DMPC:DMPE-PEG ₅₀₀₀	92:8	0.103	0.116	0.137	0.175		

Se observa la mayor estabilidad para liposomas formados por cadenas de PEG del menor peso molecular y con el mayor porcentaje de las mismas, ya que tras dos meses, el índice de polidispersidad apenas varía.

4.1.6 Adsorción de un homopolímero, p-(NIPAM)-COOH, y cadenas de PEG

Existen muchas más modificaciones utilizando de base los liposomas, en este caso se ha estudiado la adicción de un homopolímero, tanto dentro de la bicapa como adsorbido en la superficie, y con la adicción de fármacos, hidrofílico como es dextrano y que queda depositado en el interior del liposoma por su afinidad con el agua. La modificación de la bicapa lipídica produce cambios estructurales y por tanto la respuesta a parámetros como la temperatura o el pH van a ser diferentes.

Para comenzar con el estudio de estos nuevos sistemas se obtuvo el punto isoelectrico de estos sistemas. En estos tres casos se ha observado que apenas existe una variación del punto isoelectrico si se comparan entre ellos aunque al compararlo con el liposoma sin ningún aditivo, el punto isoelectrico se desplaza hacia valores más pequeños. Estos resultados son mostrados en la Figura 4.59. Se observa cómo varía el punto isoelectrico con respecto al liposoma sin ningún aditivo. Al añadir el polímero a la bicapa, el punto isoelectrico se sitúa a pH 5, con casi dos unidades menor comparado con el liposoma solo. Al cargar los liposomas con un fármaco de carácter hidrofílico, las variaciones no son grandes, del mismo modo ocurre al añadir tanto a la bicapa el polímero como el fármaco en el interior del liposoma. Se observa que las cargas son menores, aunque no demasiado, con cualquier aditivo, disminuyendo las interacciones electrostáticas con el agua ya que estas interacciones se comparten con las que se han formado con los nuevos sistemas. De esta forma se puede decir que la adición del homopolímero

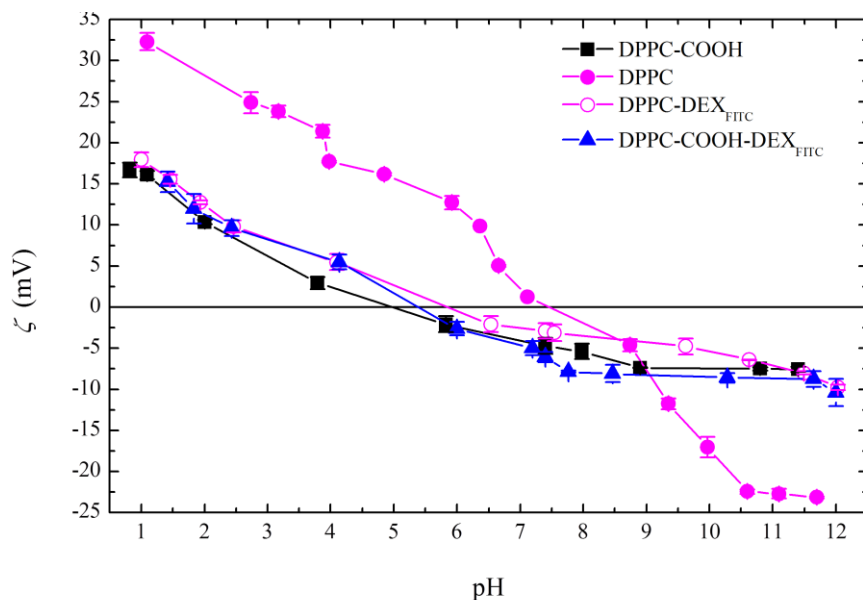


Figura 4.59 Variación del punto isoelectrico para liposomas formados por DPPC en función del tipo de compuesto añadido en la bicapa o en el interior de los liposomas. Las medias han sido realizadas a temperatura ambiente y en disolución acuosa con una fuerza iónica igual a 10mM para todas las muestras.

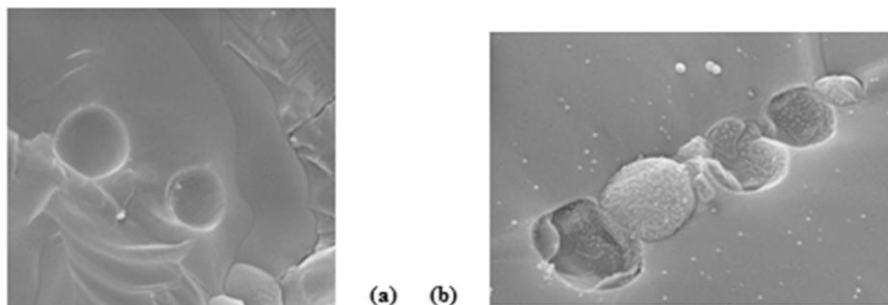


Figura 4.60 Imagen de Crio-SEM para liposomas de 1 μm a pH 7.4 en disolución tampón HEPES. La medida de los hueco que dejan las vesículas y cambiar su posición. El tamaño estimado es de 917.5 ± 92.5 nm.

estabiliza el liposoma y como a pH fisiológico la carga que adquieren es más negativa, se convierten en sistemas de mayor interés para aplicaciones de liberación.

Los estudios en estos sistemas han sido análogos a los realizados para todos los sistemas, desde la determinación del radio hidrodinámico, valor del potencial zeta y medidas con microscopía electrónica con el objeto de poder conocer los mismos parámetros. Al ser un liposoma con una temperatura de transición característica se ha realizado un análisis con calorimetría, resultados mostrados en la sección 4.1.1 Liposomas.

En este apartado se muestra la principal técnica de caracterización que se utilizó para estos sistemas. Crio-SEM es la técnica que ha ayudado a dirigir las investigaciones a la hora de decidir el mejor camino para obtener sistemas basados en liposomas cuya respuesta a la temperatura fuera controlada mediante una capa de polielectrolito que modificaba principalmente su temperatura de respuesta.

Y ya finalmente en este trabajo se han estudiado además liposomas recubiertos, por ello se desarrollaron varios experimentos para observar mediante esta técnica los liposomas con la variedad de modificaciones a las que se les sometió. Inicialmente se muestra la Figura 4.60 con una vista general de liposomas fabricados de $1\mu\text{m}$. Se observan zonas en las que no aparece el liposomas pero sí la huella de que en su momento estuvo. El valor del diámetro medido (en el hueco dejado por los liposomas tras el proceso de congelado) se corresponde con el tamaño de poro utilizado en la extrusión.

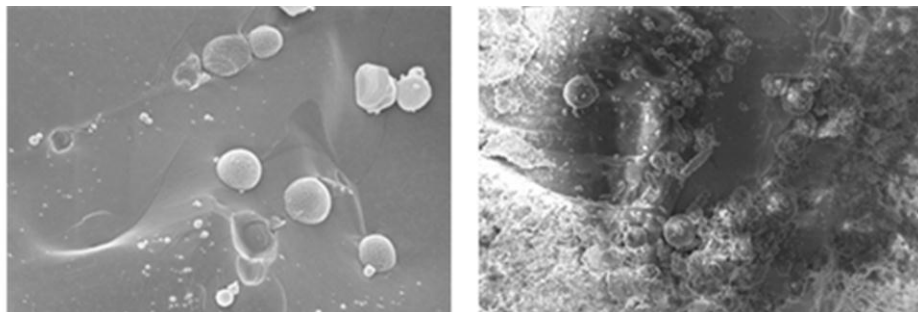


Figura 4.61 Crio-SEM con liposomas de 1 μm como control y liposomas recubiertos con polímero mediante la técnica capa a capa a pH 7.4 en disolución tampón HEPES. La medida de las vesículas es 917.5 ± 92.5 nm.

En la Figura 4.61 se observan las modificaciones realizadas con estos sistemas. Este caso muestra la aplicación de la técnica capa a capa sobre los liposomas por interacciones electrostáticas. Una vez adsorbido el polímero se centrifuga tres veces para eliminar el complejo inter-poliélectrolito formado pero en este caso observado se distinguen los liposomas recubiertos pero se observa que todavía en la disolución queda elevada cantidad de polielectrolito no adsorbido debido a que en esta muestra no han tenido lugar más adsorciones y por ello no se forman todos los complejos que se pretenden eliminar. Este experimento se ha desarrollado con una muestra control de forma que la misma muestra ha sido fotografiada sin estar en contacto con el polielectrolito y posteriormente tras la adsorción y el proceso de centrifugación. Realizando las pertinentes medidas de tamaño de los liposomas se ha observado un aumento en el tamaño del liposoma de unos pocos nanómetros.

Otro de las modificaciones realizadas en los liposomas ha sido la que se observa en la Figura 4.62. Aquí se observan liposomas sin ningún polímero añadido, como control, y liposomas con parte del polímero formando parte de la bicapa lipídica.

Al comparar las muestras de la Figura 4.62 se observa que la superficie es más heterogénea para liposomas con polímero pero sigue manteniendo tanto la forma esférica como el índice de polidispersidad característico para liposomas de este tamaño. Esto nos indica que esta forma de obtener

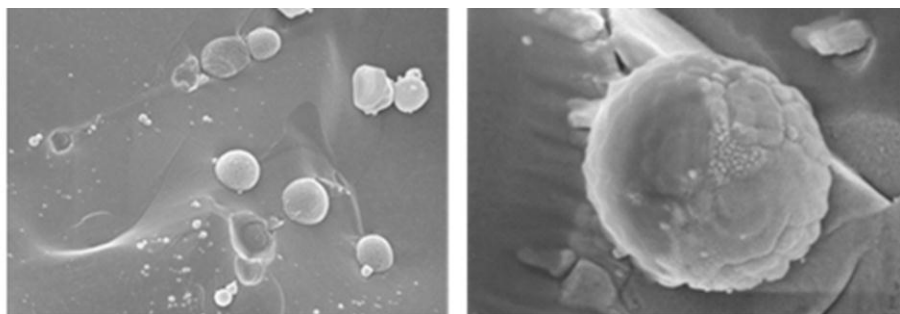


Figura 4.62 Crio-SEM con liposomas de 1 μm como control y liposomas recubiertos con polímero en la bicapa lipídica extruidos con membrana de tamaño de poro idéntico a pH 7.4 en tampón HEPES.

liposomas ha sido un éxito y con ayuda de otras técnicas se puede esclarecer si además son interesantes en aplicaciones biomédicas.

4.1.7 Estudios en sustratos planos

La microbalanza de cuarzo (QCM) se ha utilizado frecuentemente para el estudio del crecimiento de multicapas por el método capa a capa sobre sustratos planos^[365]. En esta sección se va a utilizar para seguir la adsorción de liposomas sobre dos electrodos de cuarzo de diferente naturaleza y que fueron tratados según se describe en la sección de **Técnicas de superficie**. Los objetivos perseguidos en esta sección serán la observación del patrón de adsorción seguido por los liposomas sobre sustratos planos de diferente naturaleza y obtener más información sobre la formación de multicapas de polielectrolitos una vez depositada la vesícula. Por estas razones se muestran dos de los sistemas más estudiados en esta tesis que son dispersiones de liposomas unilamelares pequeños, con un diámetro de 100 nm con carácter catiónico, como es el caso de DOPC:DODAB y con carácter zwitteriónico como es DOPC, ambos con una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Tras estudiar con detenimiento el proceso para los liposomas depositados sobre el sustrato plano se adsorbieron los polielectrolitos y los pares elegidos han sido PSS/PAH en disolución acuosa con la misma fuerza iónica y concentración; PGA/PLL estudiados en disolución tamponada y misma fuerza iónica.

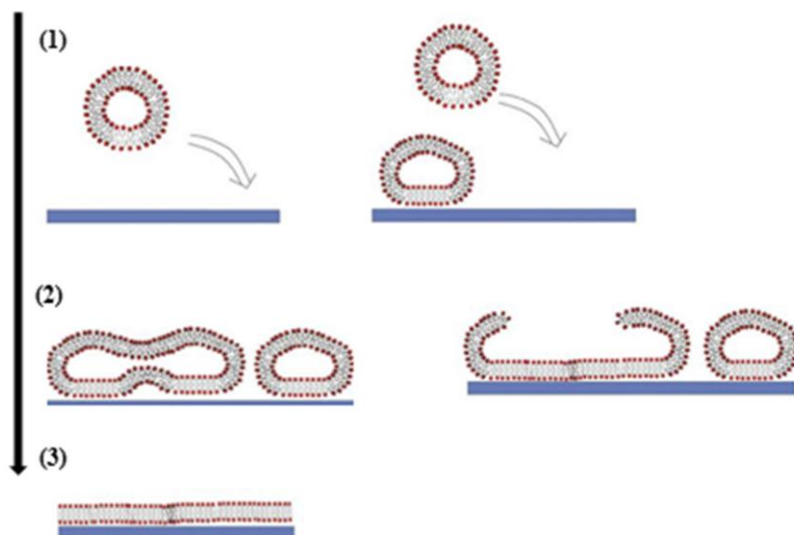


Figura 4.63 Adsorción de liposoma unilamelar sobre una superficie hidrofílica^[22]. Se han observado tres pasos desde que se pone en contacto la disolución de liposomas con el sustrato hasta que se forma la bicapa de lípidos y se comentan en el texto.

Inicialmente, tras estabilizar la medida, se ha estudiado la cinética de adsorción de liposomas y polielectrolitos con el objeto de poder conocer más en profundidad si la adsorción de los liposomas sigue algún proceso que pueda afectar al tiempo en que quedan depositados sobre el sustrato plano. Una vez determinada la cinética de cada proceso, se estudiará el espesor de las capas depositadas que, en el caso de los polielectrolitos debiera corresponder con los datos obtenidos por técnicas como DLS.

La primera capa depositada es de liposomas en disolución acuosa, que en contacto con una superficie dan lugar a una bicapa de lípidos que ha de ser estudiada con detenimiento en los dos tipos de sustratos. La forma de obtener esta bicapa sigue los principios desarrollados por McConnell^[365] y consiste en el contacto directo de la superficie plana con los liposomas unilamelares induciendo a la ruptura y fusión de los liposomas adsorbidos para formar una continua bicapa de lípidos. Entre estudios teóricos desarrollados hace décadas y varios desarrollos experimentales^[366-370] se ha podido concluir que la formación de la bicapa ocurre en tres fases principalmente que pueden mostrarse de una forma más o menos

pronunciada^[371, 372] y son: Adsorción inicial de los liposomas intactos a la superficie, recubrimiento crítico de liposomas que da lugar al inicio de la ruptura de los liposomas para dar lugar a una bicapa, si bien el sustrato no queda totalmente recubierto, y ruptura completa de los liposomas formando la bicapa que recubre la superficie del sustrato (Figura 4.63).

Para comenzar las medidas, la disolución de liposomas o de polielectrolitos, según sea el caso se pone en contacto con el electrodo a través de un sistema de inyección con flujo constante para que el electrodo se recubra con la primera capa. En la Figura 4.64 se muestran los comportamientos descritos en la figura anterior. Se ha observado que sobre el electrodo de oro modificado con grupos tiol se adsorbe más rápidamente formando un bicapa mientras que sobre el electrodo de silicio la adsorción es más lenta y las vesículas se adsorben como vesículas siendo más lenta la formación de la bicapa sobre el electrodo.

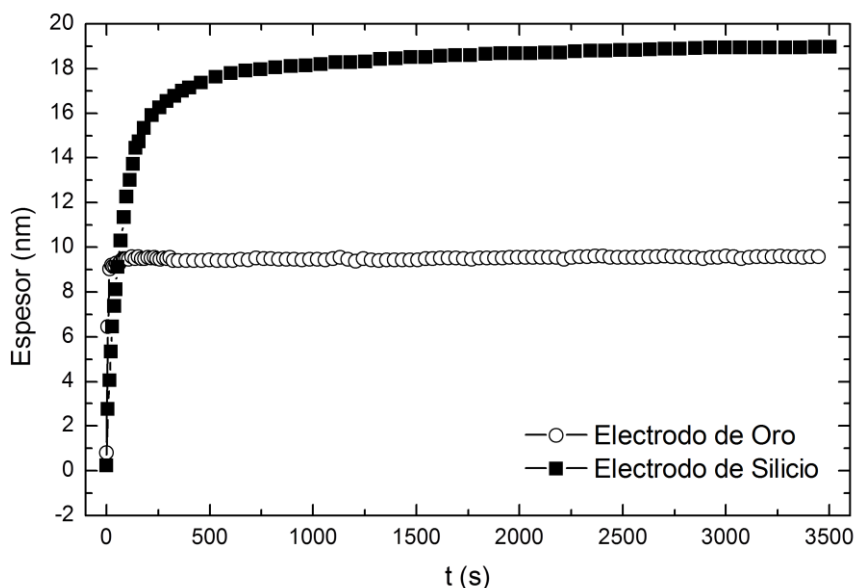


Figura 4.64 Adsorción de vesículas catiónicas sobre diferentes sustratos antes del lavado con disolución salina con la misma fuerza iónica. Ambas disoluciones tienen una fuerza iónica de 10 mM NaCl y las medidas se hicieron a 25°C.

En relación a estos datos experimentales, la primera información que se puede extraer de los datos experimentales está de acuerdo al patrón observado de decaimiento monotónico para la frecuencia y de crecimiento para la disipación durante el proceso de adsorción y siguiendo las correlaciones propuestas por Richter^[373] entre el patrón de adsorción obtenido usando D-QCM y la estructura de la vesícula adsorbida es posible asumir que la vesícula de DOPC/DODAB queda adsorbida sobre el sustrato en forma de vesícula íntegra formando lo que se conoce como una capa formada por vesículas simples (VSL, vesicle single layer). La ausencia de fusión observada para la adsorción de las vesículas de DOPC/DODAB en las condiciones utilizadas debe ser atribuida a un efecto de la densidad de carga del sistema de forma que existe un recubrimiento umbral por debajo del cual la capa contiene vesículas muy separadas no existiendo interacción suficiente entre ellas para conducir a la fusión^[372, 374].

Para el caso del ensamblaje de polielectrolitos, el tiempo medio que se deja para asegurarse que se ha realizado con éxito, es una hora. La determinación del punto de saturación, es decir, el momento en que se considera el electrodo completamente recubierto es observando el valor de la frecuencia dado en cada adsorción y que es constante cuando se depositan sobre la superficie en su totalidad.

En este momento se debe calcular la variación de frecuencia real que supone la adsorción del polielectrolito, látex o liposomas que tiene en cuenta el efecto viscoso del disolvente, que en todos nuestro caso no va a ser muy importante pues se trabaja con disoluciones acuosas. Y con este valor, mediante la ecuación de Sauerbrey se obtiene la cantidad de masa depositada sobre el electrodo.

Los resultados obtenidos mediante elipsometría, combinados con los análisis realizados con balanza de cuarzo son el punto de partida como técnicas de caracterización cuantitativas^[375] para analizar los procesos de adsorción que tienen lugar sobre liposomas unilamelares pequeños (100 nm de diámetro).

La elipsometría es una técnica indirecta de la que se extrae información física relevante sobre muestras que necesitan modelos ópticos basados en la teoría magnética y el modelo óptico elegido se describe en **Técnicas de superficie** que corresponde a un modelo de capas paralelas caracterizadas por el índice de refracción. Cuanto mejor es la aproximación obtenida con el

modelo elegido más nos acercaremos a la estructura real de la muestra estudiada^[324, 376, 377].

La combinación de Microbalanza de Cuarzo Disipativa (D-QCM) sobre una superficie de silicio y Elipsometría permite analizar junto al proceso de deposición ciertas propiedades de las multicapas obtenidas (propiedades mecánicas y contenido en agua)^[378]. El análisis de los datos de los experimentos se realizó para la D-QCM usando el modelo propuesto por Johannsmann et al.^[317] y para el caso de la elipsometría usando un modelo de cuatro capas^[379, 380]. Se muestra a continuación dos de los sistemas estudiados que difieren en el tipo de liposoma y polielectrolitos adsorbidos.

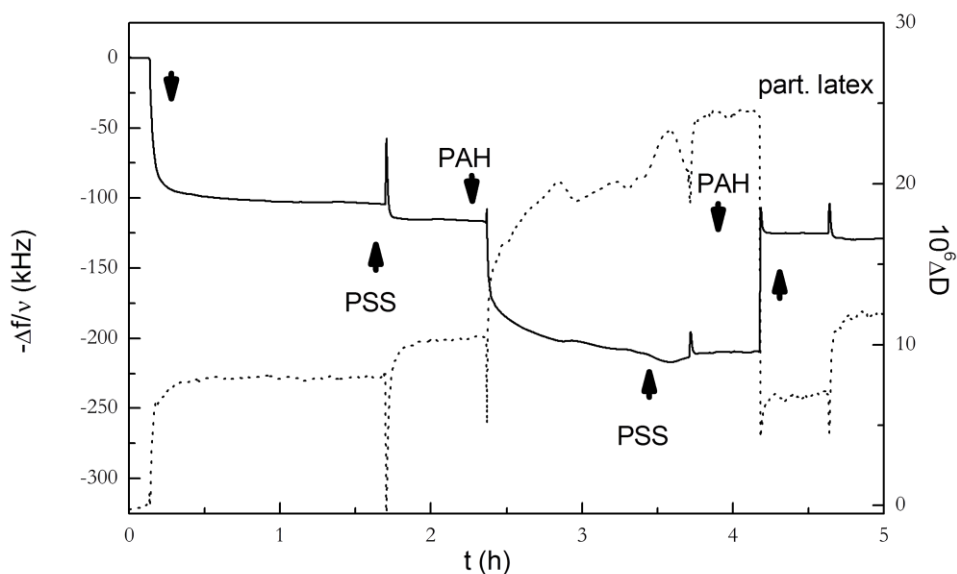


Figura 4.65 Secuencia de adsorción para (PSS+PAH) sobre una vesícula de DOPC+DODAB (70:30) adsorbida sobre un sustrato plano. La línea continua representa la variación de frecuencia, Δf , normalizada por el número de armónico, ν , para el tercer armónico, $(\Delta f / \nu)_{3rd}$, y la línea discontinua indica la variación de disipación para el mismo armónico, ΔD . Las flechas indican la inyección del material que se adsorbe y los procesos de lavado, flechas continuas para inyección de material y flechas discontinuas para la introducción de las disoluciones de lavado.

Multicapa (PSS+PAH)₂-látex sobre Vesículas de DOPC+DODAB (70:30)

La Figura 4.65 muestra la variación temporal de frecuencia normalizada y disipación debida a la adsorción de las vesículas que forman la capa precursora y de las dos primeras capas (PSS+PAH). Una información relevante que se puede extraer hace referencia a la irreversibilidad de los procesos de adsorción de material como muestra la pequeña variación de la señal por los procesos de lavado^[381]. La adición produce rápidas variaciones en la señal durante el procesos de inyección observadas en los datos experimentales, por lo que dichos saltos deben ser considerados como un artefacto de la medida y no son tenidos en cuenta para el análisis de los procesos de adsorción^[382, 383].

Un análisis detallado del proceso de adsorción de las capas de polielectrolito en la Figura 4.65 permite inferir la estructura de la capa adsorbida. Es posible suponer dos motivos por los que el par de polielectrolitos quedan adsorbidos: la expulsión de agua debido a la

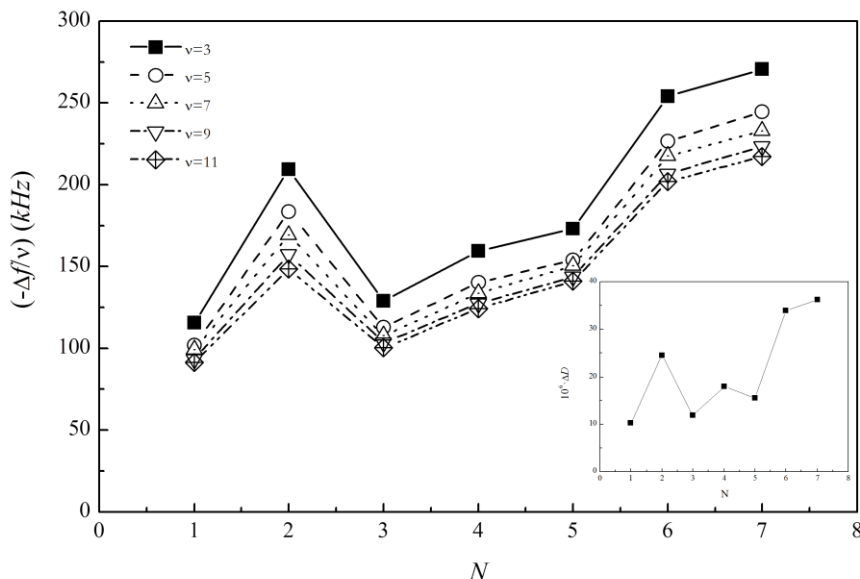


Figura 4.66 Dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $(-\Delta f / \nu)$. La figura del interior muestra la dependencia en N de la variación del factor de disipación para el tercer armónico, ΔD .

complejación de las capas adyacentes o a la desorción de parte del material previamente adsorbido por la formación de complejos interpolielectrolito.

La Figura 4.66 presenta la dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $-(\Delta f / \nu)$. De las variaciones de frecuencia es posible confirmar que la adsorción de las capas de PSS lo hacen con una estructura bastante difusa con una fuerte variación de la disipación que se ve reducida con la adsorción de las capas de PAH, esto puede ser atribuido a la compactación de la película obtenida debido a la complejación de las cadenas de las dos capas consecutivas. Especialmente significativo es el caso de la capa de PSS adsorbida sobre la capa de vesículas donde debido a la reducida carga de las vesículas adsorbidas la disipación tiene mayor variación. Adicionalmente la adsorción de la capa formada por las partículas de látex ($\phi=22$ nm) provoca un fuerte descenso en la frecuencia de resonancia y en la disipación lo que puede estar correlacionado con la formación de una capa donde la rugosidad

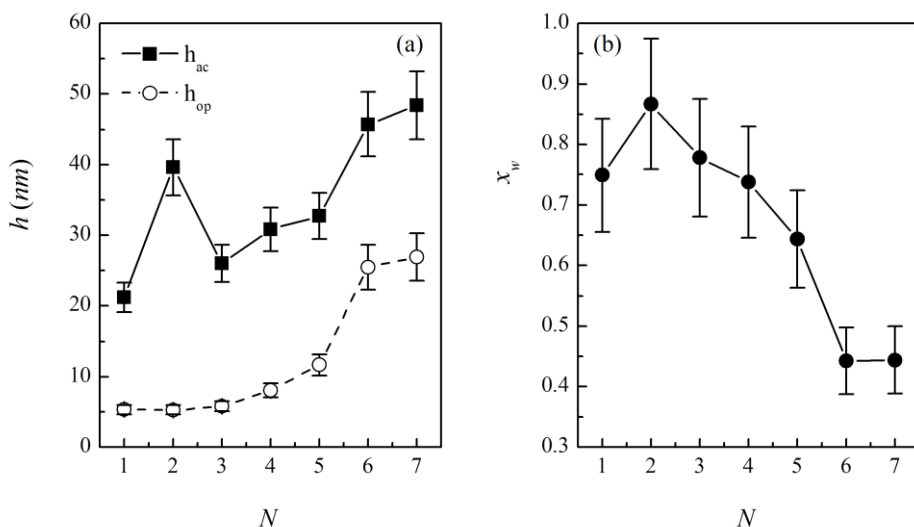


Figura 4.67 (a) Dependencia con el número de capas, N , de los espesores acústico, h_{ac} , y el espesor óptico, h_{op} , obtenido por el análisis de los datos de los experimentos realizados usando D-QCM y elipsometría, respectivamente. (b) Dependencia con el número de capas, N , del contenido en agua, X_w , de la multicapas obtenido por la comparación de los datos obtenidos usando D-QCM y elipsometría, respectivamente.

es elevada debido a la forma esférica de las partículas.

La Figura 4.67 (a) muestra las dependencias de h_{ac} y h_{op} con el número de capas, N y (b) muestra el contenido en agua asociada a la multicapa.

Lo primero que se puede observar de los datos en la Figura 4.67 (a) es que $h_{ac} > h_{op}$, esto es debido a la distinta sensibilidad de las técnicas consideradas a la cantidad de materia adsorbida ^[384]. Mientras que la D-QCM no distingue si la cantidad de materia adsorbida sobre el cristal es debida al material adsorbido o al agua asociado, la elipsometría como está basada en las diferencias de índice de refracción solo da información de la cantidad de material adsorbido sin considerar el agua, dado que el índice de refracción del agua asociada a la multicapa y al agua libre no son lo suficientemente distintos para ser distinguidos. La diferencia en la tendencia de los datos de elipsometría y D-QCM, es principalmente un efecto par-impar observado mediante QCM, aunque poco pronunciado puede ser considerada como una confirmación de que no existe desorción durante el proceso de complejación sino simplemente una compactación de la película formada con posible liberación de moléculas de agua atrapadas en la multicapa.

Del análisis de los datos obtenidos mediante microbalanza de cuarzo (D-QCM) y elipsometría es posible realizar una estimación de la cantidad de materia adsorbida, obteniéndose el espesor acústico, h_{ac} , y el espesor óptico, h_{op} , respectivamente. Para ello se debe utilizar el formalismo propuesto por Vörös ^[384] donde el porcentaje de agua, X_w , en peso en la multicapa se calcula como,

$$X_w = \frac{h_{ac} - h_{op}}{h_{ac}} \quad (4.5)$$

Este método de cálculo del contenido en agua de multicapas conduce a valores concordantes con los que se pueden obtener usando reflectividad de neutrones ^[379]. En la Figura 4.67 (b) los valores del contenido en agua de la película oscilan entre el 50-90 % a lo largo de las distintas fases del crecimiento estudiadas. El contenido en agua decrece al incrementar el número de capas con una excepción en el caso de la adsorción de la capa de PSS directamente anclada a las vesículas donde el contenido en agua aumenta ligeramente lo que parece confirmar el escenario donde el polímero forma una especie de capa sobre las vesículas que posteriormente es compactada. El efecto de compactación inducido por el PAH es evidenciado

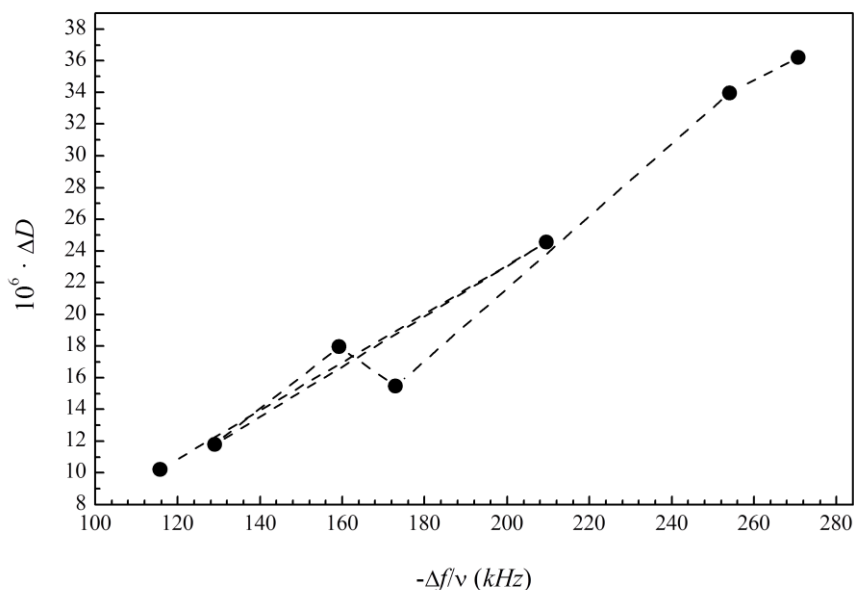


Figura 4.68 Representación ΔD vs. $-(\Delta f / \nu)$ para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC:DODAB (70:30) sobre sustrato plano y con capas sucesivas de partículas de látex y el par de polielectrolitos PSS/PAH en disolución con 10 mM NaCl.

en la adsorción de las capas 4 y 5 donde la adsorción de PSS (capa 4) provoca una menor reducción en el contenido en agua que la capa de PAH (capa 5).

La Figura 4.68 muestra la representación de ΔD vs. $-(\Delta f / \nu)$. Los resultados están en concordancia a lo discutido anteriormente. La adsorción de una capa de látex produce un marcado incremento de la disipación debido a la formación de una estructura homogénea que es una consecuencia de la naturaleza esférica de estas partículas.11

Del análisis de los experimentos realizados usando D-QCM es posible obtener información de las capas depositadas en forma de las componentes real e imaginaria del módulo de cizalla, G' y G'' . La Figura 4.69 muestra las dependencias con N de G' y G'' . Los resultados correspondientes a las propiedades mecánicas de la multicapa estudiada presentan valores del orden de los MPa. Los resultados muestran una ligera mayor contribución de

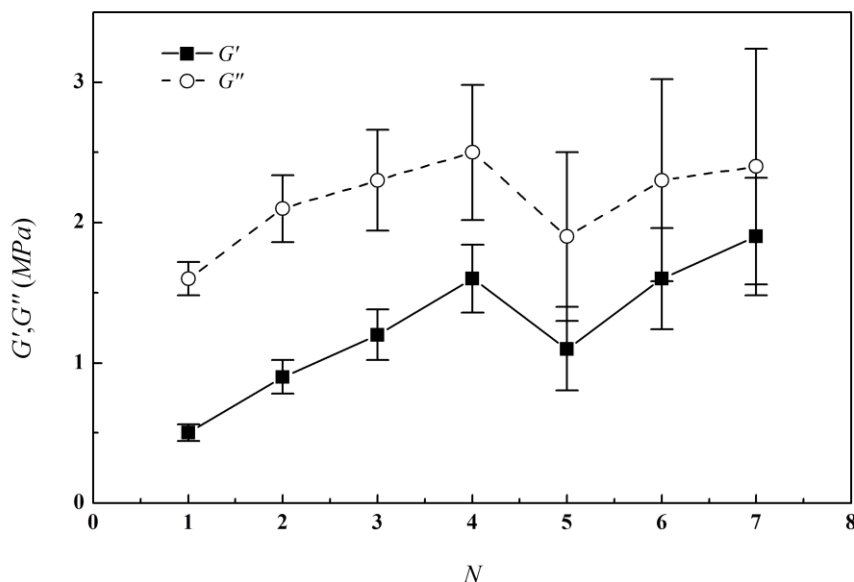


Figura 4.69 Dependencia con el número de capas, N , del las componentes del módulo de cizalla, G' y G'' para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC:DODAB sobre sustrato plano y con capas de polielectrolitos PSS/PAH con la penúltima capa adsorbida sobre los liposomas de partículas de látex en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl.

G'' en buena concordancia los efectos debido a la importancia de las propiedades viscoelásticas del sistema considerado.

Multicapa PEI-(PGA+PLL)₂ sobre Vesículas de DOPC

A continuación se muestran los resultados correspondientes al sistema formado por liposomas de carácter zwitteriónico adsorbidos sobre el sustrato y sobre el cual se depositan los polielectrolitos PEI y el par alternado PGA/PLL. Este estudio permite mostrar ciertas diferencias a la hora de adsorber diferentes sistemas y por ello es importante que el estudio se detalle de la misma forma que el anterior sistema.

La Figura 4.70 muestra la variación temporal de frecuencia normalizada y disipación debida a la adsorción de las vesículas que forman la capa precursora y de las tres primeras capas PEI-(PGA+PLL). Se muestra la adsorción intacta de la vesícula sobre el sustrato plano, y como

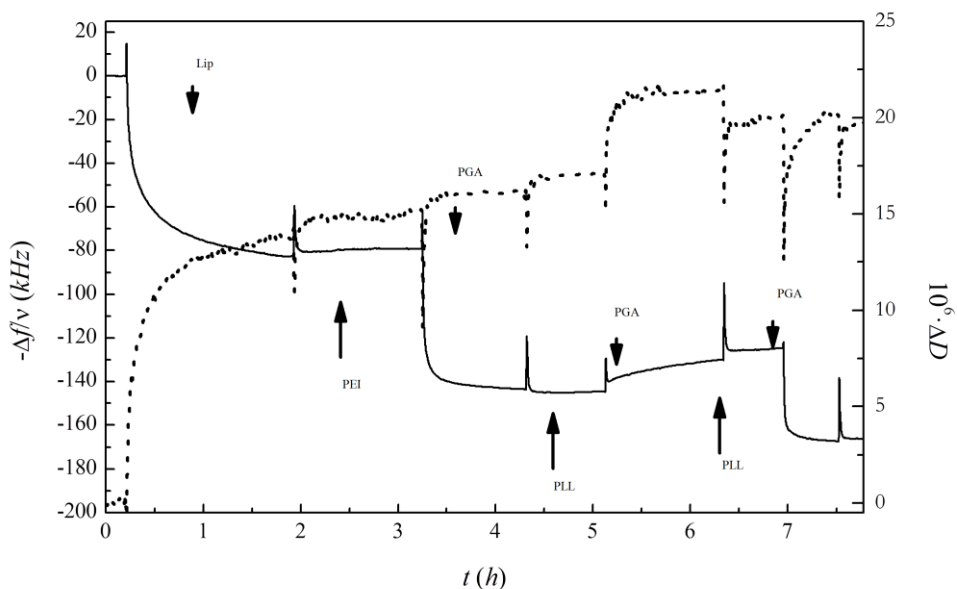


Figura 4.70 Secuencia de adsorción para PEI(PGA+PLL) sobre una vesícula de DOPC adsorbida sobre un sustrato plano. La línea continua representa la variación de frecuencia, Δf , normalizada por el número de armónico, ν , para el tercer armónico, $(\Delta f / \nu)_{3rd}$, y la línea discontinua indica la variación de disipación para el mismo armónico, ΔD . Las flechas indican la inyección del material que se adsorbe y los procesos de lavado, flechas continuas para inyección de material y flechas discontinuas para la introducción de las disoluciones de lavado.

consecuencia la adsorción de los polielectrolitos sufrirá algunas modificaciones, si se compara con el sistema anterior, como se observa a continuación.

Un análisis detallado del proceso de adsorción de las capas de polielectrolito evidencia un patrón de adsorción de las capas de policación (PEI y PLL) similar al esperable con un decaimiento monótonico de la frecuencia lo que confirma un mecanismo de deposición con una adsorción efectiva de material en la multicapa, sin embargo, para la adsorción de las capas de polianión un crecimiento en la frecuencia de resonancia es observada lo que puede ser atribuido a dos posibles motivos: la expulsión de agua debido a la complejación de las capas adyacentes o a la desorción de parte del material previamente adsorbido por la formación de complejos

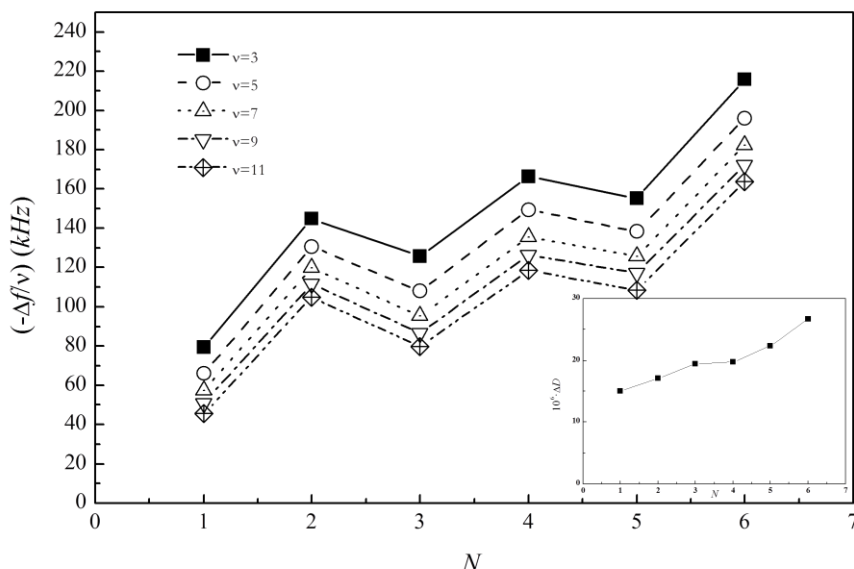


Figura 4.71 Dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $-(\Delta f/\nu)$. La figura insertada muestra la dependencia en N de la variación del factor de disipación para el tercer armónico, ΔD .

interpolielectrolito entre el PGA y la capa de policación previamente adsorbida, esto no indica que no haya deposición de cadenas de polianión sino que el balance global es de una desorción. Este fenómeno de desorción parece ser el que existe en el sistema considerado dado que junto al crecimiento de la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo, es posible observar un fuerte crecimiento en la disipación lo que parece indicar la formación de una capa con estructura difusa o *fuzzy*. Un estudio más detallado de los datos puede ayudarnos a entender la fenomenología implicada en la formación de las multicapas aquí estudiadas.

La Figura 4.71 presenta la dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $-(\Delta f/\nu)$. Lo que se observa es la ausencia de solapamiento entre las curvas correspondientes a los diferentes armónicos e indica que la ecuación de Sauerbrey^[313] no es aplicable para obtener la cantidad de materia adsorbida y es necesario la aplicación de modelos que consideren las propiedades viscoelásticas de la multicapa formada^[385]. Los resultados ponen de

manifiesto un efecto de la naturaleza del polielectrolito adsorbido en el cambio de frecuencia, existiendo un claro efecto par-impar en la deposición de la capas. En este caso el efecto es más acusado con respecto al anterior sistema.

De la misma forma que para el anterior sistema, la Figura 4.72 (a) muestra $h_{ac} > h_{op}$. Los resultados muestran un efecto par-impar con adsorción efectiva durante la deposición de las capas de polication, mientras que un decrecimiento en el material adsorbido es observado en el caso de la deposición de capas de polianión, lo cual está de acuerdo a los resultados obtenidos en D-QCM con el anterior sistema. El hecho de que este fenómeno sea observado para este sistema tanto en los datos obtenidos mediante D-QCM como en elipsometría (aunque estos resultados muestran una tendencia más suave) es una indicación de que el descenso en la masa adsorbida se debe a un proceso de adsorción de PGA. En la Figura 4.72 (b) se calcula el contenido en agua de la película que oscila entre el 30-50 % a

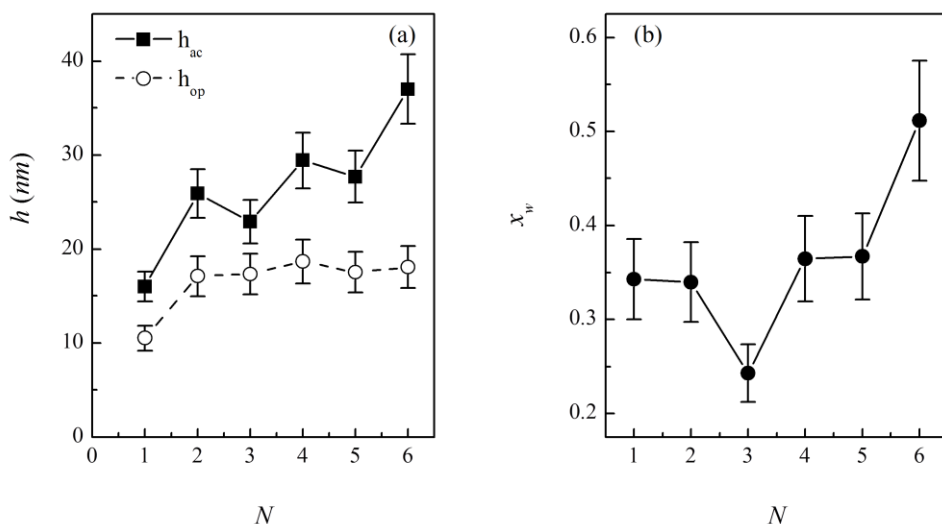


Figura 4.72 (a) Dependencia con el número de capas, N , de los espesores acústico, h_{ac} , y el espesor óptico, h_{op} , obtenido por el análisis de los datos de los experimentos realizados usando D-QCM y elipsometría, respectivamente. (b) Dependencia con el número de capas, N , del contenido en agua, X_w , de la multicapas obtenido por la comparación de los datos obtenidos usando D-QCM y elipsometría, respectivamente.

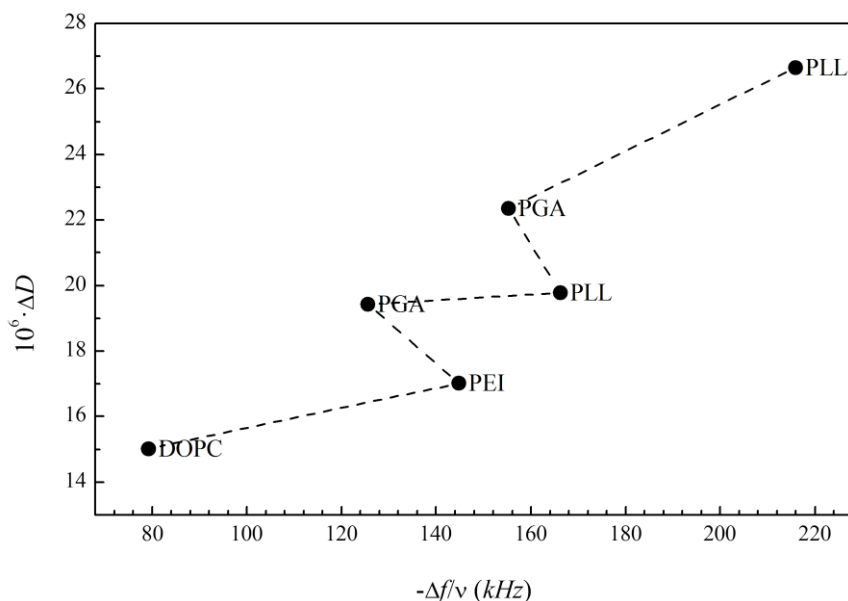


Figura 4.73 Representación ΔD vs. $-(\Delta f / \nu)$ para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC sobre sustrato plano y con capas sucesivas del par de polielectrolitos PGA/PLL con una capa inicial adsorbida sobre los liposomas de PEI en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl.

lo largo de las distintas fases del crecimiento estudiadas, estos valores están de acuerdo con los encontrados para otras multicapas formadas por biopolímeros^[378, 386]. Sin embargo es importante indicar que a diferencias de las multicapas simplemente constituidas por polielectrolitos, la presencia de vesículas como capa precursora inducen valores iniciales de contenido en agua inferiores a aquellos encontrados en multicapas formadas solo por polielectrolitos.

La Figura 4.73 muestra la representación de ΔD vs. $-(\Delta f / \nu)$. Esta figura puede ayudar a entender la fenomenología asociada a la construcción de la multicapa^[387]. Los resultados evidencian un incremento de la disipación durante todo el crecimiento de la multicapa lo que indica que la estructura de la multicapa tiene un alto grado de desorganización estructural, especialmente interesante es el caso de la adsorción de PGA.

De nuevo, el análisis de los experimentos realizados usando D-QCM permite obtener información de las capas depositadas en forma de las componentes real e imaginaria del módulo de cizalla, G' y G'' . La Figura 4.74 muestra la dependencia con N de G' y G'' . El estudio de estas magnitudes confirma las diferencias en el proceso de adsorción sobre el sustrato plano. Se muestra que G' y G'' presentan valores del orden de MPa lo que les confiere el comportamiento similar a polímeros en estado de caucho o *rubber*^[388], este tipo de comportamiento ha sido anteriormente observado para diversas multicapas de polielectrolitos^[389]. Los resultados muestran una ligera mayor contribución de G'' en buena concordancia con lo comentado anteriormente sobre la importancia de las propiedades viscoelásticas del sistema considerado. Es importante indicar que el mismo efecto par-impar observado en la cantidad de materia adsorbida es observado en la variación de G' y G'' , considerando esto en valores relativos, la importancia de G'' aumenta en los ciclos de deposición de PGA lo que parece confirmar un escenario donde el PGA arranca parte del polielectrolito adsorbido en la capa previa conduciendo a una multicapa con una estructura más difusa o *fuzzy*.

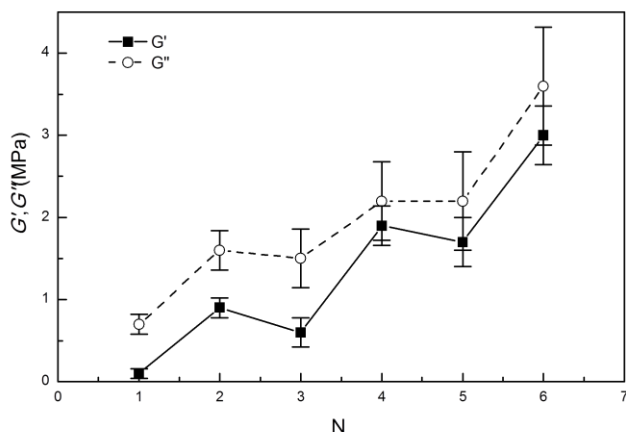


Figura 4.74 Dependencia con el número de capas, N , de las componentes del módulo de cizalla, G' y G'' para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC sobre sustrato plano y con capas de polielectrolitos PGA/PLL con una capa inicial adsorbida sobre los liposomas de PEI en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl.

Se finaliza esta sección realizando una comparación de los espesores obtenidos para estos dos sistemas por Dispersión de luz, Balanza de cuarzo y Elipsometría que se muestra en la Figura 4.75. Estos resultados que indican la posibilidad del uso de cualquiera de las tres técnicas para estudiar el crecimiento de las multicapas sobre los liposomas. La idea principal de esta figura es facilitar la comparación y comprobar las diferencias entre la adsorción sobre sustratos esféricos y sobre sustratos planos. El hecho es que con la técnica de dispersión se obtienen resultados cercanos a los obtenidos mediante elipsometría, y con la misma tendencia que los obtenidos con Balanza de cuarzo. Esto conduce a facilitar la labor investigadora con los liposomas y sus recubrimientos dado que el estudio con sustratos planos se realiza con mayor rapidez y sobre todo se minimiza el uso de reactivos. De este modo se plantea un nuevo método de trabajo que consiste en optimizar los sistemas de interés mediante estudios sobre sustratos planos alternando con algunos estudios sobre sustratos esféricos. Este método que comienza con la utilización de técnicas de superficie, permite determinar el tiempo de

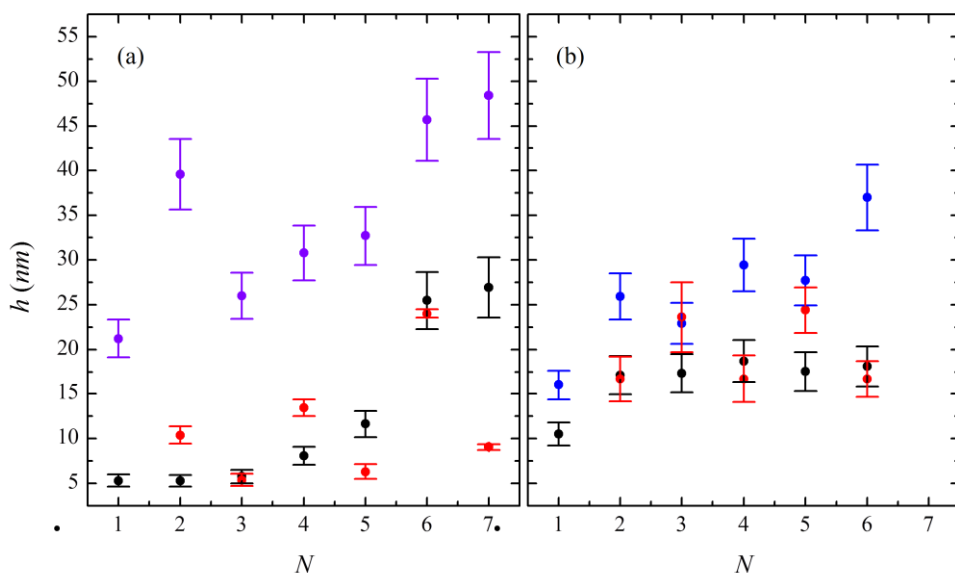


Figura 4.75 Variación del espesor con el número de capas mediante Dispersión de luz (●), Balanza de cuarzo, (●) y Elipsometría, (●), para los sistemas formados por (DOPC:DODAB)-(PSS/PAH)-Latex-PAH, (a), y DOPC-PEI-(PGA/PLL)₂, (b).

adsorción de los polielectrolitos sobre la bicapa o vesícula lipídica, el espesor para cada capa y la cantidad adsorbida de agua al utilizar polielectrolitos de diferente naturaleza. Finalmente es la técnica de Dispersión de luz, en este caso, la que confirma el tamaño del sistema creado, determina la existencia de agregados y puede dar una idea sobre los factores que pueden afectar al sistema, tal como pH, temperatura, fuerza iónica, etc.

4.1.8 Ensayos de liberación para los sistemas formados

Liberación de DEX-FITC

El trabajo descrito en esta sección ha sido realizado en el laboratorio de la profesora Dr.Bridgette Boudhlal en la Universidad de Massachusetts. El estudio final realizado para observar la funcionalidad de los sistemas de liposomas estudiados ha sido la liberación de un fármaco. Inicialmente se ha probado con dextrano, que sirve de modelo para el estudio de muchos sistemas de liberación. Este fármaco posee un marcador fluorescente que nos permite controlarlo con el fluorímetro. Se ha medido inicialmente el sistema para comprobar que no existía fluorescencia, ya que en el caso que hubiera, significa que no se ha lavado bien la muestra pues tan solo se busca que la cantidad de fármaco en la disolución esté en el interior de los liposomas.

En la Figura 4.76 se realiza una comparativa de los resultados obtenidos para la fluorescencia emitida tras la degradación de los liposomas formados por DPPC. La temperatura máxima a la que se han desarrollado los experimentos ha sido 45°C alcanzando la temperatura de transición característica del fosfolípido que forma el liposoma. Se observa que el liposoma sin recubrimiento libera rápidamente su carga, comienza a 26°C con más de un 20% liberado. Al modificar el liposoma con polímero, la liberación se hace más lentamente, alcanzando ese mismo porcentaje a 35°C. Si además al liposoma modificado con el polímero se recubre con PEG la liberación queda controlada, la temperatura a la que el 20% está liberado coincide con la temperatura de transición del homopolímero y una vez alcanzada esa temperatura se libera el 80% de la carga. hasta llegar a 42°C, temperatura a la que se ha liberado el 100%.

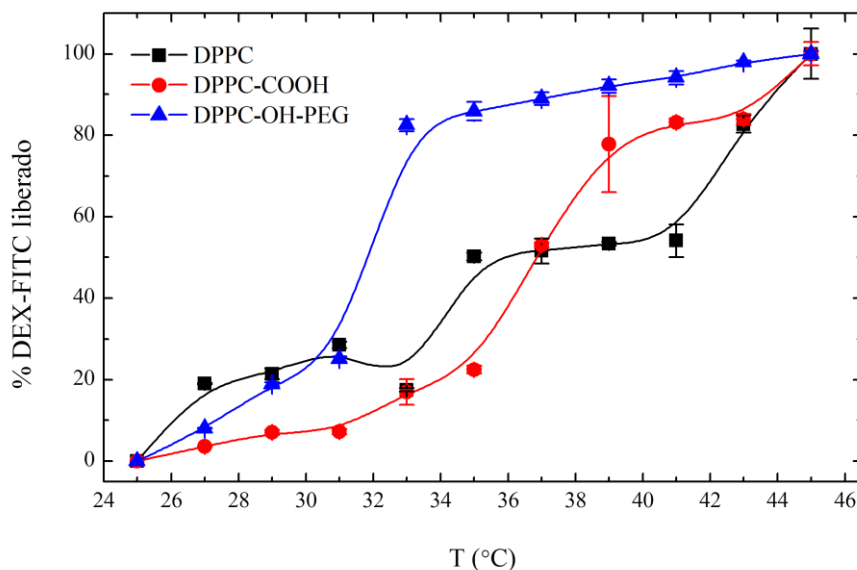


Figura 4.76 Comparativa de la liberación de DEX marcado con FITC en liposomas zwitteriónicos de DPPC de 1 μm a pH 7.4. Se observa la cantidad de fármaco liberado para liposomas con polímero en la bicapa y para liposomas con una capa adicional de PEG ensamblado mediante la técnica denominada *pegylation post-coating*.

Para conocer si realmente se había liberado todo el fármaco, estas disoluciones se pusieron en contacto con un surfactante, TRITON X-100 diluido al 10% en agua. Añadiendo un exceso de este tensioactivo se ha observado que la señal de fluorescencia varía con el tiempo, lo que parece indicar que es punto final de la liberación.

Liberación de DOX-FITC

DOX-FITC es un fármaco muy utilizado para el tratamiento de cáncer. Dada su alta toxicidad y para que el tratamiento resulte más efectivo se encapsula en diferentes sistemas tales como micropartículas, micelas poliméricas, dendrímeros y liposomas. En el mercado ya se encuentran comercializados sistemas liposomares que encapsulan este fármaco, el más conocido es *DoxilTM*.

Esta ha sido una de las razones por las que se ha seleccionado para comprobar la eficacia de nuestros sistemas en el campo de la medicina. De todos los tipos de liposomas estudiados se ha seleccionado aquel que posee una temperatura de transición por encima de la temperatura corporal, es el mismo utilizado para la liberación de dextrano tras observar el éxito con el mismo. Los liposomas estudiados están formados por DPPC que han sido modificados con un homopolímero derivado de p-(NIPAM) para formar lo que se conoce como liposomas con termorrespuesta de una forma controlada y al mismo tiempo aumentar su estabilidad con respecto al medio.

Una vez optimizado el sistema con este polímero se ha ensamblado una capa de PEG y así, además de poseer esta termorrespuesta mencionada se convierte en un sistema biocompatible que puede ser dirigido hacia la célula enferma sin ser destruido por el camino. Para asegurar el ensamblaje de PEG se ha realizado una condensación, de forma que la terminación ácida del homopolímero $-\text{COOH}$ reacciona con la terminación $-\text{NH}$ del PEG

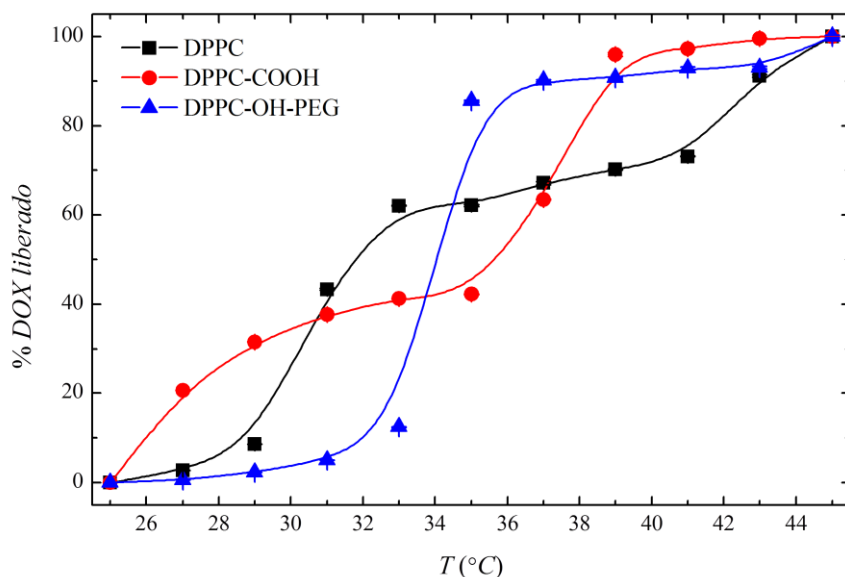


Figura 4.77 Comparativa de la liberación de DOX marcado con FITC en liposomas zwitteriónicos DPPC de 1 μm a pH 7.4. Se observa la cantidad de fármaco liberado para liposomas con polímero en la bicapa y para liposomas con además una capa de PEG ensamblado mediante la técnica denominada *pegylation post-coating*.

formándose un enlace lo suficientemente estable como para que no sea degradado. Esta forma de ensamblar PEG a cualquier superficie se denomina *post-coating* y la reacción es muy usada cuando se busca un enlace estable bajo condiciones de degradación.

El procedimiento seguido para la liberación de este fármaco ha sido cuidadosamente realizado y desarrollado por triplicado para asegurar su eficacia. En la Figura 4.77 se muestra el porcentaje normalizado del fármaco liberado para liposomas de 1 μm . Se observa que para liposomas con DOX la liberación se realiza lentamente, cuando el liposoma se encuentra modificado con el homopolímero, es decir situado en la bicapa junto al fármaco, la liberación se realiza rápidamente, a 27°C ya se ha liberado el 20%, pero ya en el caso del liposoma modificado con PEG, la liberación sigue la misma tendencia que sin ningún aditivo con la diferencia que a 36°C prácticamente se ha liberado el 100%. Se puede decir que el PEG ha mejorado la capacidad de liberación y queda probada su eficacia a temperatura fisiológica.

4.2 MICROGELES

En este trabajo se ha desarrollado un estudio completo de microgeles de poli-(isopropilacrilamida)-co-vinilimidazol, p-(NIPAM)-co-VI, desde su síntesis hasta su caracterización en este trabajo. La elección del vinilimidazol se debe al gran número de aplicaciones médicas en las que está involucrado por su respuesta al pH del medio^[390, 391]. Los microgeles son otra alternativa a los liposomas cuando se desean utilizar en aplicaciones biomédicas donde una de sus ventajas con respecto a los liposomas puede ser la mayor estabilidad.

El microgel p-(NIPAM)-co-VI fue sintetizado por polimerización precipitación radical, tal y como se explica con detenimiento en el subapartado de **Síntesis de microgeles**, con el fin de obtener microgeles catiónicos en los que la carga se sitúa en el exterior del mismo^[392]. Una vez formado se almacena en forma sólida y en un recipiente esmerilado y lo más hermético posible con el fin de evitar que la luz y el entorno provoquen variaciones en sus propiedades iniciales. El fluoróforo que se eligió para estudios de fluorescencia fue rodamina cuyas características se han detallado en el capítulo de **Materiales y métodos** y da al microgel el aspecto rosado (Figura 4.78).

4.2.1 Variación del tamaño con la temperatura y pH

Se ha realizado un estudio de la influencia de la temperatura^[393, 394], fuerza iónica^[148] y pH en el tamaño^[390], centrándonos en las condiciones relevantes para posibles aplicaciones bio-médicas.^[391, 395]

El comportamiento de este microgel en disolución acuosa fue inicialmente estudiado a diferentes pH. El estudio principal se ha centrado en el rango de pH 5-9 debido a su relevancia en el proceso endosomal y en la acidificación extracelular de tumores. La incorporación de VI en el microgel modifica los enlaces de hidrógeno entre la estructura del microgel y las moléculas de agua^[396], y por tanto es importante conocer la variación de tamaño con la temperatura a diferentes pH,

La interacción tamaño-temperatura de gran importancia en estos sistemas ha sido estudiada mediante la dispersión de luz dinámica.



Figura 4.78 Aspecto del microgel sintetizado denominado p-(NIPAM)-co-VI.

En la Figura 4.79 se representa la variación del radio hidrodinámico aparente con la temperatura para tres valores de pH (3.3, 8.5 y 9.2). En todos los casos se observa un comportamiento reversible (calentamiento/enfriamiento) a pesar de las notables diferencias de tamaño para los distintos pH. La temperatura de transición no se ha observado en el rango de temperaturas estudiadas a pH bajo, el microgel se resiste al colapso incluso por encima de la temperatura de transición por lo que se espera que sea mayor que en los otros casos.

En primer lugar, el microgel p-(NIPAM)-co-VI en agua, a un pH 8.5, tiene un R_H de 230 nm, presenta la temperatura de transición alrededor de 34-36°C, y disminuye hasta los 96 nm. Se ha podido observar que cuando el pH es ácido, el radio inicial es mayor que en soluciones con pH básico. De forma general, cuando el pH tiene valores pequeños, el vimilmidizol se desprotona y se produce una repulsión entre las cadenas poliméricas dando lugar a una expansión en el volumen del microgel, por lo que se observa que fijada la temperatura, a medida que aumenta el pH el tamaño es menor ya

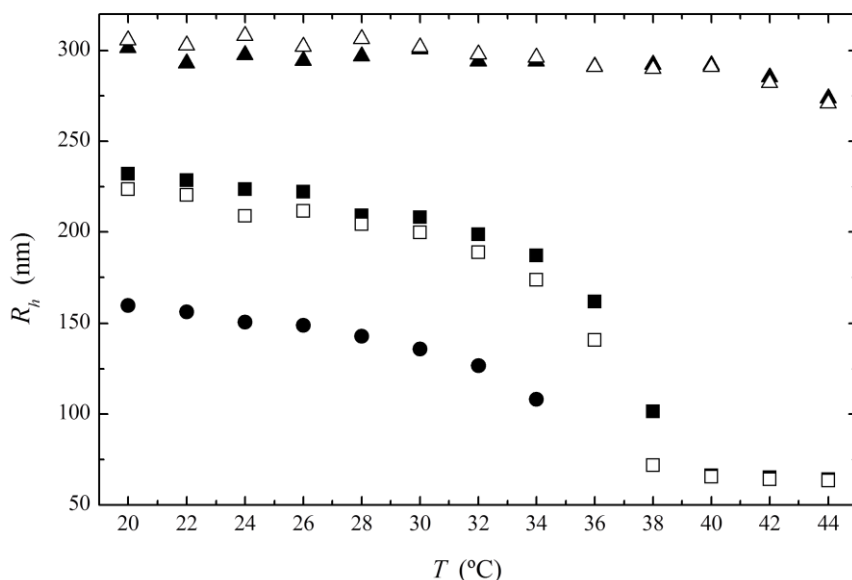


Figura 4.79 Variación del radio hidrodinámico del p-(NIPAM)-co-VI sin recubrir en función de la temperatura en disolución acuosa a diferentes pH: pH 3.3 (\blacktriangle), pH 8.5 (\blacksquare) y pH 9.2 (\bullet). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento.

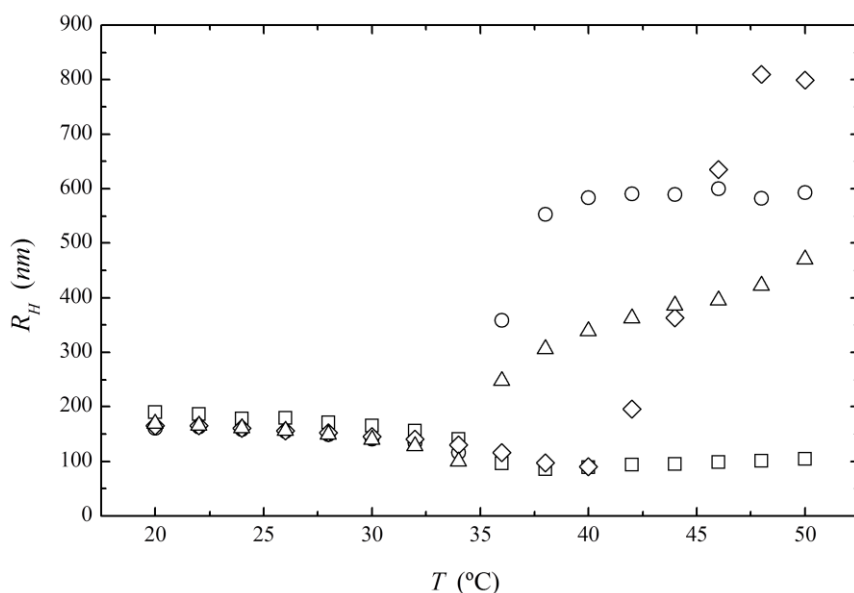


Figura 4.80 Variación del radio hidrodinámico del microgel p-(NIPAM)-co-VI con la temperatura a diferentes valores de fuerza iónica: sin adición de sal (□), con 0.1 M NaCl (○), con 0.25 M NaCl (◇) y con disolución tampón y 0.15 M NaCl (Δ).

que disminuye la hidrofobicidad entre las cadenas del microgel.

En este tipo de microgeles se ha logrado combinar perfectamente la respuesta a la temperatura por parte del p-(NIPAM) y la respuesta al pH por parte de VI. Esta terminación favorece los enlaces de hidrógeno con el agua, con lo que se facilita la disolución en la misma además de aumentar la temperatura de colapso del microgel.

La fuerza iónica, otro parámetro importante a la hora de fijar en el estudio de estos sistemas produce una gran influencia en la distribución de las cadenas del microgel, como se observa en la Figura 4.80. Por debajo de la temperatura de transición, el microgel p-(NIPAM)-co-VI es independiente de la fuerza iónica, al llegar a temperaturas mayores, alrededor de 34°C, se produce la formación de agregados. Tan solo para el microgel en disolución acuosa sin sal añadida, al llegar a dicha temperatura se colapsa dando lugar a un tamaño más pequeño que es el comportamiento típico para un microgel de estas características.

Si se fija la temperatura, el valor del R_H con diferentes fuerzas iónicas apenas varía, dentro del error experimental, pero se observa una ligera disminución del mismo con y sin presencia de fuerza iónica. Esto está de acuerdo con el efecto de la sal en la temperatura de transición de p-(NIPAM)^[397], el apantallamiento de las cargas en el microgel por los contraiones presentes en la disolución reduce la repulsión electrostática, por lo que el tamaño del microgel es menor $R_H(\approx 170 \text{ nm})$ en presencia de la sal que en su ausencia ($R_H \approx 190 \text{ nm}$).

4.2.2 Recubrimiento capa a capa con polielectrolitos

Una vez disuelto el microgel en agua miliQ se procedió a recubrirlo con diferentes pares de polielectrolitos y se estudió el efecto de la temperatura en el tamaño y en la movilidad electroforética para distintas fuerzas iónicas (Ver Figura 4.81). Los polielectrolitos elegidos fueron, por un lado PSS/PDADMAC y por otro lado PGA/PLL. El método utilizado para los recubrimientos es el ensamblamiento capa a capa por interacciones electrostáticas, detallado en el apartado 1.5.3 del capítulo de **Introducción y objetivos** y consiste en añadir la disolución del polielectrolito a la disolución de microgel y una vez mezcladas se centrifuga tres veces a 50.000 rpm durante 30 minutos.

Inicialmente se muestran los datos correspondientes al efecto de la temperatura en el tamaño del microgel a medida que se añaden las capas de

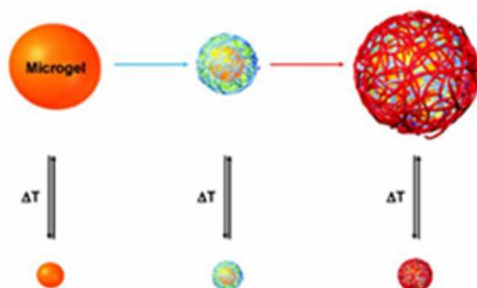


Figura 4.81 Ilustración de la respuesta que muestra un microgel recubierto con diferentes polielectrolitos al aumentar la temperatura^[390].

los pares de polielectrolitos estudiadas y para evitar confusión se muestra en el apartado los valores de la movilidad electroforética en función de la temperatura donde se hace una comparación de los valores obtenidos para todas las capas.

PSS/PDADMAC

Se comenzó estudiando la adsorción del par de polielectrolitos PSS/PDADMAC. Este sistema se ve afectado por la fuerza iónica y por esta razón se realiza con ella fija. En la Figura 4.82 se muestran las curvas de termorrespuesta medidas por DLS para el microgel sin recubrir en función de la temperatura comparada con las curvas obtenidas para las muestras con varias capas adsorbidas sobre el mismo de PSS y PDADMAC en disolución con una fuerza iónica de 0.1 M NaCl. La temperatura de transición a la que

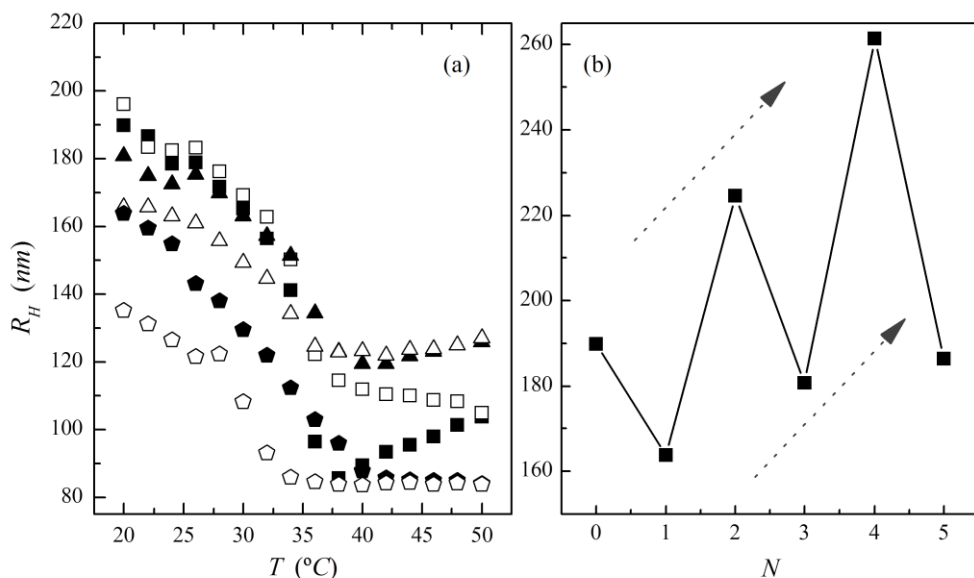


Figura 4.82 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina}-(PSS/PDADMAC). El microgel en agua miliQ y los polielectrolitos disueltos en 0.1M NaCl sin recubrimiento (\square), con una capa de polielectrolito (\circ) y tres capas de polielectrolitos (Δ). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Las flechas grises muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas.

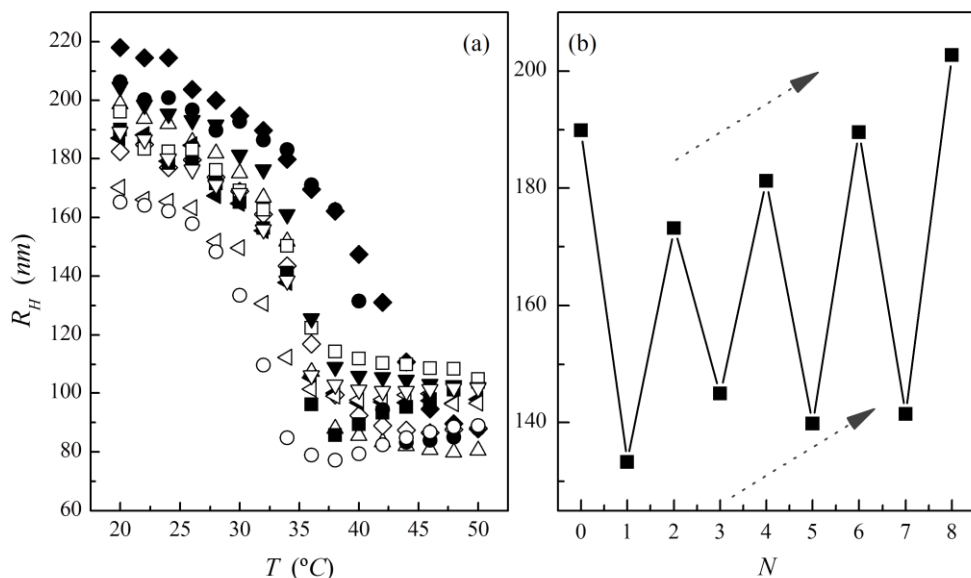


Figura 4.83 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para el microgel p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina}-(PSS/PDADMAC). El microgel está en agua miliQ y los polielectrolitos disueltos con una fuerza iónica de 0.25 M NaCl sin recubrimiento (\square), con la primera capa de polielectrolito (\bullet) y segunda capa de polielectrolitos (\blacktriangledown), cuarta capa (\triangle), quinta capa (\blacklozenge), seis capas (\blacktriangledown). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Las flechas grises muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas.

tiene lugar el colapso del microgel tiende a ser de 32-34°C.

En la Figura 4.83 se presenta el microgel p-(NIPAM)-co-VI con un R_H de 190 nm; pero se produce una disminución grande del radio, con la adsorción de la primera capa de PSS en 0.25 M NaCl, pasando a 140 nm. La temperatura de colapso no se ve afectada por la presencia de la capa, y el microgel con PSS ya recubierto se colapsa hasta un radio de 90 nm. Tras la adsorción de la segunda capa (PDADMAC) hay un pequeño aumento en el R_H a 204 nm. Una vez más la temperatura de transición no se ve afectada, y el R_H de la microgel de dos capas recubiertas en el estado colapsado es ligeramente superior a la del microgel. Según se va produciendo el recubrimiento de la segunda capa, hay una disminución notable del R_H con

cada capa más externa de PSS y hay un aumento significativo del R_H de la capa más externa es PDADMAC.

Al acercarse la carga positiva PDADMAC a la superficie, el microgel con PSS, tendrá que compartir el número de cargas negativas entre el microgel y la capa adsorbida de PDADMAC. El fortalecimiento de la interacción atractiva entre PSS y el acercamiento del PDADMAC se hace a expensas de la atracción entre el microgel y la capa de PSS ya adsorbido. Se ha demostrado previamente que los microgeles recubiertos y que acaban con una capa de PSS son más hidrofílicos y por lo tanto absorben más agua que cuando se terminan las capas con PDADMAC^[398], así la capacidad de las capas para contener más agua conduce a una disminución en el entrelazamiento de las cadenas de polielectrolitos, permitiendo adoptar una conformación más compacta^[390].

Con la Figura 4.84 se muestra un comportamiento que solo se produce a alta fuerza iónica, la variación de la temperatura de transición en función del número de capas. Con el polianión, la temperatura a la que la conformación

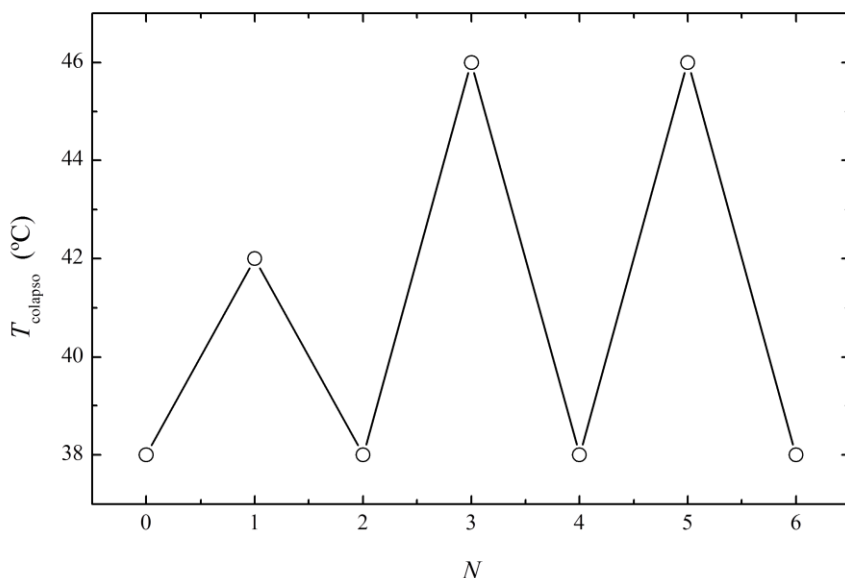


Figura 4.84 Temperatura de transición para p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en H₂O y recubierto con los polielectrolitos (PSS/PDADMAC) en 0.25M NaCl y a 20°C.

del microgel cambia, se colapsa, aumenta a medida que aumentan las capas, pero con el policación, esa temperatura se mantiene constante en aproximadamente 38°C, por el momento no tenemos ninguna explicación para este peculiar resultado.

El comportamiento del microgel en función de la temperatura es completamente reproducible independientemente del número de capas y tras varios experimentos con muestras que tienen las mismas características.

Cuando durante la aplicación de la técnica LbL, el microgel en disolución acuosa está expuesto a un exceso del polielectrolito con además mayor concentración salina, el microgel también responde a la presencia de sal en la solución. Esto significa que cuando las multicapas de PSS /PDADMAC se adsorben sobre el microgel sin fuerza iónica presente, se están depositando en una plantilla que es ≈ 190 nm, mientras que para los preparados a partir de diferentes concentraciones de NaCl (0.1 M y 0.25 M), los polielectrolitos son depositados en una plantilla que tiene una disminución del tamaño efectivo debido a las interacciones electrostáticas entre la sal y el microgel^[148, 399]. Por tanto, esta es una posible razón por la que a 0.25 M NaCl se obtiene un aumento lineal de los espesores pero menor al que se debiera obtener si se compara con 0.1 M NaCl de fuerza iónica. A esto se suma la variación del pH que sufren los sistemas al añadir más capas de polielectrolitos tras el lavado que como se ha observado en la Figura 4.83, al aumentar el pH, disminuye el tamaño. Por esta razón no es posible comparar cuantitativamente los resultados obtenidos para ambos sistemas, aunque sí que podemos hacer un estudio cualitativo referido a cómo varía el radio y la movilidad electroforética en función de las capas.

Se define razón de hinchamiento a la relación que existe entre el volumen en estado de hinchado y el menor volumen obtenido en el estado de colapso tras superar la temperatura de transición del sistema, según se observa en la ecuación (4.6).

$$r = \left(\frac{R_H^{\text{hinchado}}}{R_H^{\text{colapsado}}} \right)^3 \quad (4.6)$$

Se ha comparado la razón obtenida en este estudio y se observa un aumento de la razón de hinchamiento a medida que aumenta la fuerza iónica del medio, lo que está de acuerdo con la teoría^[400]. Para el caso de sistemas estudiados a 0.1 M NaCl esta razón es del orden de 3 que aumenta al

aumentar el número de capas; lo mismo ocurre con la razón a 0.25 M NaCl que será del orden de 13.0 y que también aumenta pero más rápidamente a medida que crecen las capas debido a la mayor presencia de contraiones.

Se han estudiado por DLS microgeles recubiertos con cuatro bicapas. La Figura 4.85 muestra que la evolución del radio hidrodinámico durante el calentamiento es consistente con la teoría. En estos resultados no se ha fijado el pH de las disoluciones de los polielectrolitos pero se comprobó siempre antes y después del ciclo de centrifugación y se muestran en la Tabla 4.11. Se observa que el pH apenas varía antes y después del lavado, manteniendo aproximadamente el mismo pH durante el ensamblaje y por tanto los datos obtenidos pudieran ser comparados a diferentes pH.

Por el contrario, en la adsorción de polielectrolitos a mayora fuerza iónica el pH varía desde su lavado mediante centrifugación y después de estos lavados (Tabla 4.12). Los datos así obtenidos reflejan la inestabilidad a altas fuerzas iónicas y por tanto no existe un control que permita la comparación con los otros resultados. Se observa una variación del pH antes y después del lavado para los sistemas a medida que aumentan las capas de los polielectrolitos y con una fuerza iónica de 0.25M, lo cual pudiera estar afectando a los valores que se obtienen de tamaño aparente y por tanto

Tabla 4.11 pH medido antes y después del ciclo de centrifugación medidos a 20°C.

Sustrato	Número de capas	Antes del lavado	Después del segundo lavado
p-(NIPAM)-co-VI/PSS	1	7.6	8.8
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{1,0}	2	7.0	7.0
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{1,5}	3	7.3	8.3
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{2,0}	4	7.4	7.8
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{2,5}	5	7.8	8.1
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{3,0}	6	7.0	7.2
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{3,5}	7	7.4	7.8
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{4,0}	8	6.7	6.8

Tabla 4.12 pH medido antes y después del ciclo de centrifugación medidos a temperatura ambiente, 20°C y a la mayor fuerza iónica.

Sustrato	Número de capas	Antes del lavado	Después del segundo lavado
p-(NIPAM)-co-VI/PSS	1	6.3	8.5
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{1,0}	2	5.6	6.6
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{1,5}	3	5.9	7.7
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{2,0}	4	5.2	7.2
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{2,5}	5	7.0	8.0
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{3,0}	6	5.5	6.5
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{3,5}	7	5.9	7.3
p-(NIPAM)-co-VI/(PSS/PAH) _{4,0}	8	5.4	6.7

indica que estos estudios deben hacerse con el pH controlado para permitir comparaciones ya que pierde sensibilidad al pH a partir de la segunda capa adsorbida.

PGA/PLL

La utilización de estos polielectrolitos implica que las disoluciones de los mismos sean tamponadas para mantener el pH constante durante el proceso de recubrimiento. En este caso no se ha variado la fuerza iónica ya que serían demasiados parámetros a controlar y se fija en 0.15 M NaCl. La disolución reguladora está formada por la mezcla de TRIS y MES, detallada en el apartado de **Técnica capa a capa sobre sustratos esféricos** y el pH seleccionado es 7.4.

La Figura 4.85 muestra el comportamiento de polielectrolitos en disolución tamponada de PGA y PLL basado en el número de capas. Podemos ver que a medida que aumentan las capas, el aumento del radio hidrodinámico es muy diferente de la conducta observada hasta ahora. Este tipo de polielectrolitos son fuertemente dependientes del pH y a este pH 7.4 adopta una conformación más expandida y por lo tanto, y por lo tanto el

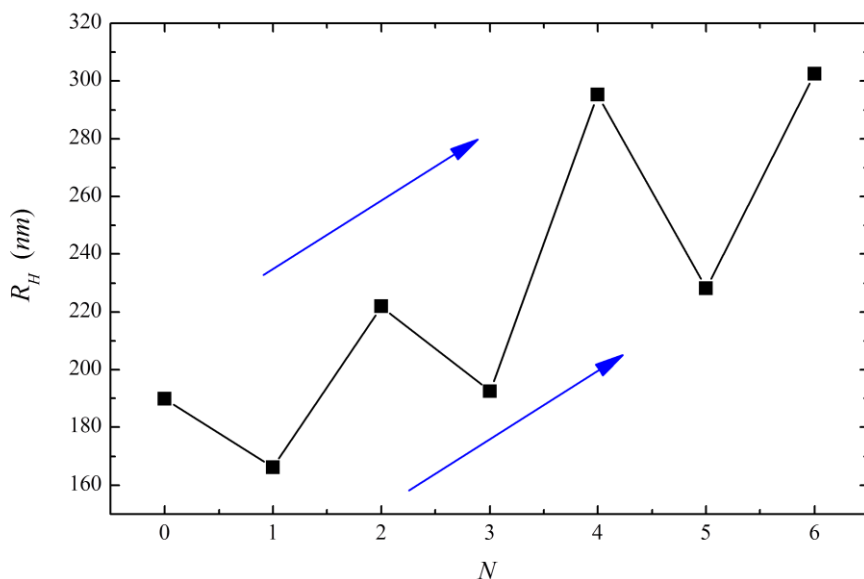


Figura 4.85 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura del sistema p-(NIPAM)-co-VI_(Rodamina)-(PLL/PGA)_n. El microgel está en agua y los polielectrolitos en disolución tampón a pH 7.4 y con 0.15M NaCl. Las flechas azules muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas.

incremento del radio es mayor. En todas las capas depositadas se observó el efecto "par-impar" con un aumento lineal a medida que crecen las capas.

Una vez observado el efecto de los polielectrolitos sobre el tamaño del microgel, se pasará a observar el mismo efecto sobre la movilidad electroforética. Ambos comportamientos son reversibles, independientes de la concentración salina presente en la disolución, es un detalle importante en la posible aplicación de estos sistemas como biotransportadores teniendo en cuenta su respuesta en función de las condiciones del medio en que se encuentren inmersos.

Una vez obtenido el radio hidrodinámico en función de la temperatura se han comparado todos los sistemas estudiados observando que el aumento del espesor es lineal para todos los casos. Cuando el pH no es controlado se espera que como en estudios anteriores desarrollados en el grupo de Richtering, el microgel se vuelva independiente del mismo y como no es así,

se debe trabajar fijando el pH y es así como se puede comparar los espesores obtenidos en todos los sistemas.

4.2.3 Variación de la Movilidad electroforética con T

En el caso de los microgeles se ha optado por mostrar los datos obtenidos en el equipo de potencial zeta como movilidad electroforética y no de potencial zeta por dos razones principalmente, una de ellas son la variación del tamaño que se obtiene cuando parámetros como temperatura, pH y fuerza iónica cambian^[401], y la segunda la posibilidad de que no se cumplan

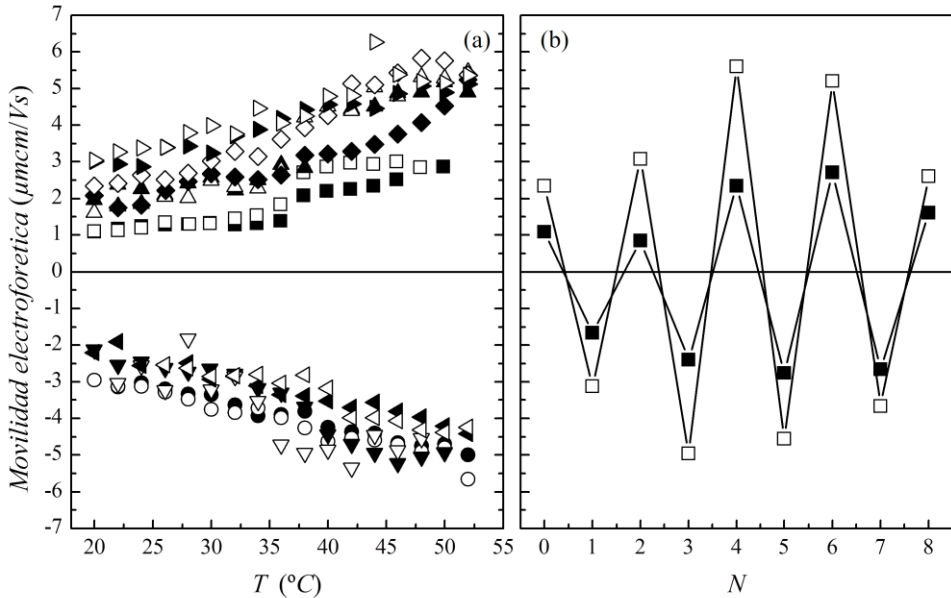


Figura 4.86 (a) Variación de la movilidad electroforética con la temperatura para el microgel de carga positiva p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.1M NaCl donde los símbolos (■□) representan al microgel sin recubrimiento, con la primera capa de polielectrolito (●○), segunda capa de polielectrolitos (▼), cuarta capa (▲Δ), quinta capa (◆◇). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. (b) Variación de la movilidad electroforética en función del número de capas que recubren el microgel donde (■) indica la movilidad electroforética medida a 25°C y (□) la movilidad electroforética medida a 44°C después de la temperatura de colapso.

las aproximaciones de Smoluchowski y Hückel que se detallan en el capítulo de **Técnicas experimentales**, en el apartado de **Potencial Zeta**.

Para cada capa, se representó la movilidad electroforética en función de la temperatura (la temperatura aumentó de 293 a 313 K y enfriamiento de 313 K a 293 K, con un aumento de la temperatura de 2 K). Cada punto es la media de diez medidas, y la muestra se mantuvo en equilibrio durante 10 minutos a cada temperatura. La Figura 4.86 muestra la movilidad electroforética del microgel cargado positivamente, y la respectiva a las capas de PSS/PDADMAC que van recubriéndolo con una fuerza iónica de 0.1 M NaCl. El éxito de inversión de carga se observó en cada paso de la

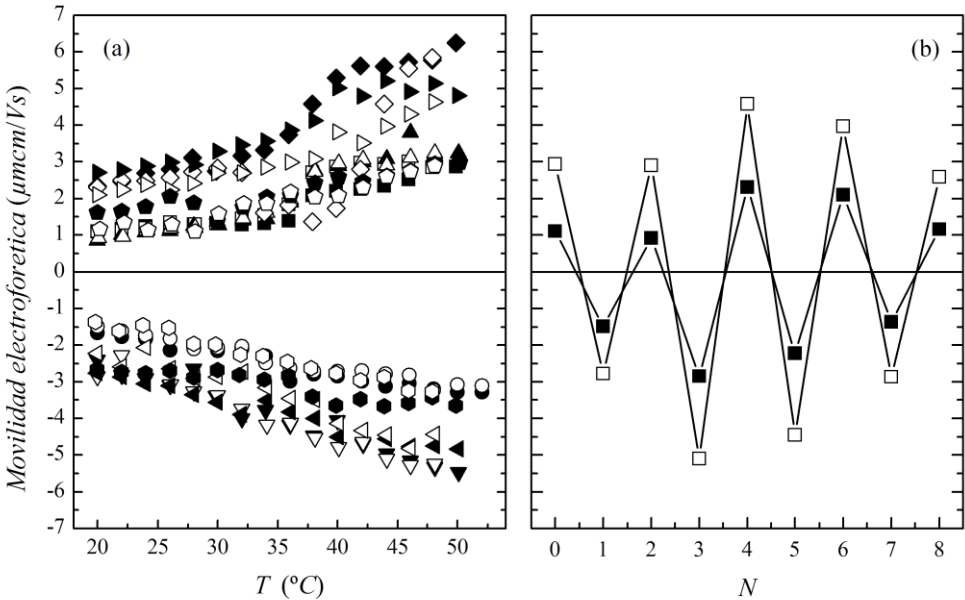


Figura 4.87 (a) Variación de la movilidad electroforética con la temperatura para el microgel p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.25 M NaCl sin recubrimiento y con diferente número de capas donde los símbolos (■□) representan al microgel sin recubrimiento, con la primera capa de polielectrolito (●○), segunda capa de polielectrolitos (▼), cuarta capa (▲△), quinta capa (◆◇). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Variación de la movilidad electroforética en función del número de capas que recubren el microgel donde (■) indica la movilidad electroforética medida a 25 $^{\circ}C$ y (○) la movilidad electroforética medida a 44 $^{\circ}C$ después de la temperatura de colapso.

adsorción, indicando claramente la acumulación de múltiples capas^[400, 402].

La Figura 4.87 muestra la movilidad electroforética del microgel medida en función de la temperatura y para el total de capas adsorbidas sobre el microgel. El polianión y policación se encuentran en una solución de 0.25 M de NaCl. El éxito de inversión de carga se observó en cada paso de la adsorción observando un análogo comportamiento al obtenido para 0.1 M NaCl.

Se sabe que durante la formación de capas de polielectrolito, la adsorción sobre la superficie es irreversible, pero su forma de estructurarse depende de la fuerza iónica de la disolución de polielectrolito, tal como muestra la Figura 4.88 como varía la movilidad electroforética para los sistemas estudiados con PSS/PDADMAC con distinta fuerza iónica. En este caso se observa que la movilidad electroforética apenas se ve afectada por la fuerza iónica dentro del error experimental.

Se ha estudiado la variación de la movilidad electroforética para los sistemas formados por el microgel y el par de polielectrolitos PGA/PLL en

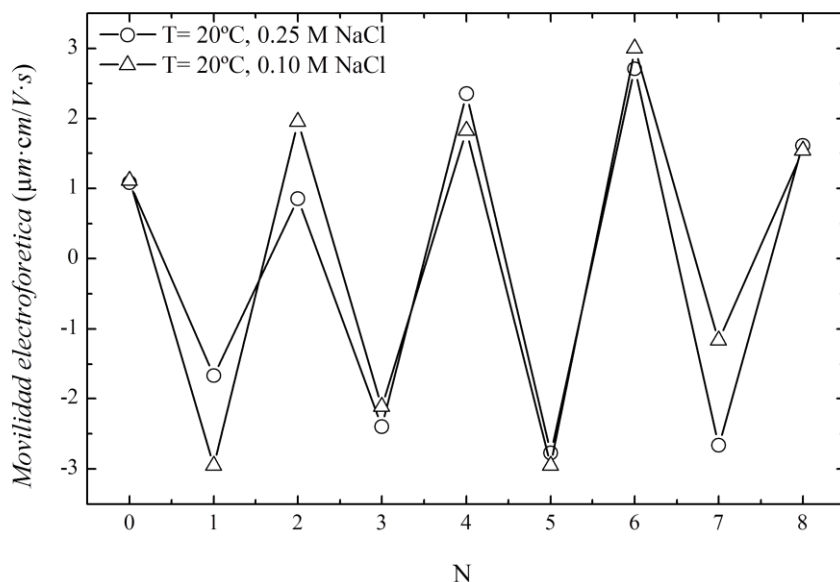


Figura 4.88 Variación de la movilidad electroforética con el número de capas de polielectrolitos para el microgel de carga positiva p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.1M NaCl, 0.25M NaCl. Temperatura medida 25°C.

disolución tampón y con el pH 7.4. Se comenzará mostrando el comportamiento de los polielectrolitos ya que son sensibles al pH: A pH 7.4, condiciones de un medio fisiológico, PLL (pKa 10.6) y PGA (pKa 4.3) están ionizados³². El grado de ionización de ambos polielectrolitos depende de la fuerza iónica del medio, de forma que con esta fuerza iónica, el pKa de PLL en disolución salina se ve disminuido mientras que el de PGA aumenta.

En la Figura 4.89 se puede observar que la movilidad del microgel revestido, en todos los casos, aumenta con la temperatura. La principal razón de este efecto se debe simplemente al hecho de que cuando se produce el colapso del microgel, el volumen ocupado por el mismo es menor y por tanto la densidad superficial de carga aumenta. Un aumento de temperatura promueve la ruptura de los enlaces de hidrógeno, lo que lleva al colapso del microgel y el agua es expulsada hacia fuera. Por encima de la temperatura de transición, enlaces de hidrógeno inter e intracadena e interacciones hidrofóbicas son dominantes. Al enfriarse, el agua se convierte en un buen disolvente de nuevo y los segmentos son capaces de reorganizarse en el

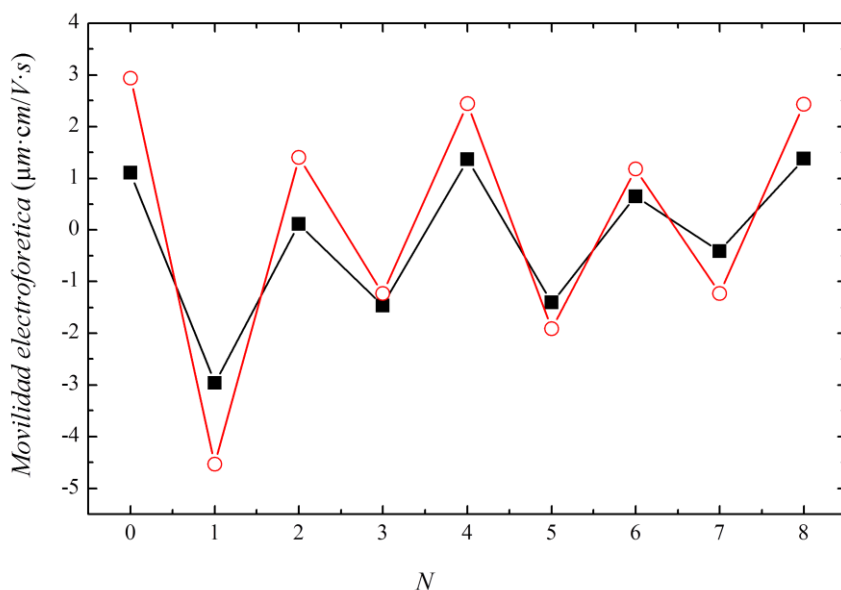


Figura 4.89 Variación de la movilidad electroforética con el número de capas de polielectrolitos para p-(NIPAM)-co-VI con el par de polielectrolitos PGA/PLL en disolución tamponada a pH 7.4 y medido a 25°C,(■), y a 44°C,(○), después de la temperatura de colapso.

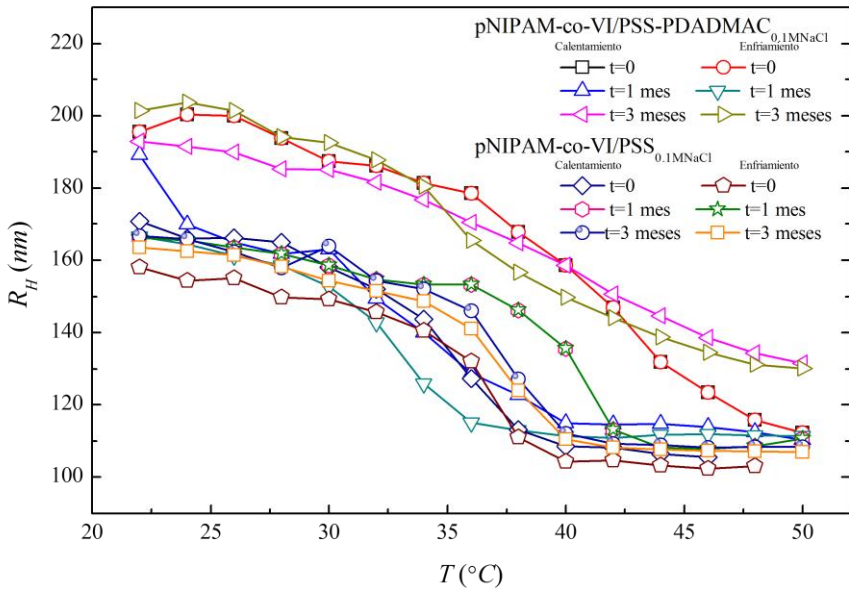


Figura 4.90 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución con fuerza iónica 0.1M NaCl. Estabilidad temporal del microgel recubierto por la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento.

microgel, de forma que vuelve a recuperar su forma inicial y el comportamiento será reversible.

4.2.4 Estabilidad del microgel

A la hora de estudiar la estabilidad de estos sistemas formados por el microgel recubierto con pares de polielectrolitos solo se considera la variación del tamaño con la temperatura ya que aunque la movilidad sea un parámetro muy utilizado en los estudios de estabilidad, aquí no se ha considerado³³, siguiendo las pautas del grupo en el que trabajé. Se ha seguido durante tres meses la variación del radio hidrodinámico con respecto a la temperatura para observar si con el tiempo esta respuesta sufre alguna modificación.

La Figura 4.90 y la Figura 4.91 muestran experimentos equivalentes a la variación del radio hidrodinámico con la temperatura para microgeles recubiertos con una y dos capas y realizados a fuerza iónica 0.1 M NaCl y 0.25 M NaCl, respectivamente, donde el tiempo cero corresponde al momento de la preparación.

En la Figura 4.90 se muestra cómo varía el radio con la temperatura para dos sistemas a medida en disolución pasa el tiempo con fuerza iónica igual a 0.1 M NaCl que. Cuando han transcurrido tres meses, el radio del sistema estudiado se hace mayor y su temperatura de colapso también. Aun con esta variación de tamaño, la variación con la temperatura sigue la misma tendencia pasado el tiempo. La primera capa, PSS, aumenta mucho el tamaño cuando pasan tres meses. Se han considerado varias razones para explicar estos cambios, una de ellas es que al aumentar el tiempo de almacenaje, las cadenas de microgel se extienden más de forma irreversible, lo que hace que nunca recupere su tamaño inicial.

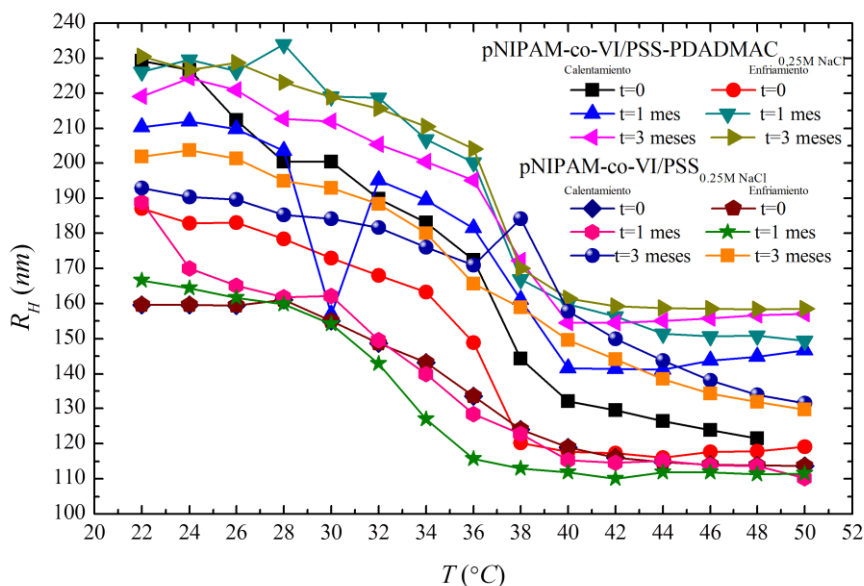


Figura 4.91 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución acuosa con fuerza iónica 0.25M NaCl. Estabilidad temporal del microgel recubierto por la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento.

Por el contrario la estabilidad mostrada por microgeles recubiertos con una y dos capas en un entorno cuya fuerza iónica es de 0.25 M NaCl es menor. La Figura 4.91 muestra la variación del tamaño con la temperatura en función del tiempo y se observa la pérdida de irreversibilidad de los ciclos de temperatura estudiados, es decir, cuando los ciclos de calentamiento y de enfriamiento no siguen la misma tendencia perdiendo así una de las características fundamentales para posibles aplicaciones.

En la Figura 4.92, se ha representado para una capa, PGA y dos capas, PGA y PLL. Para todas las curvas representadas, la temperatura de transición es siempre la misma, independientemente del tamaño obtenido. Para los dos sistemas representados no existe una variación brusca del tamaño con el tiempo incluso después del máximo tiempo medido.

Con resultados de tamaño, movilidad y estabilidad, el sistema formado por el microgel recubierto con el par de polielectrolitos PGA/PLL tamponado a pH 7.4 es el más viable si se continuaran los estudios para la búsqueda de aplicaciones.

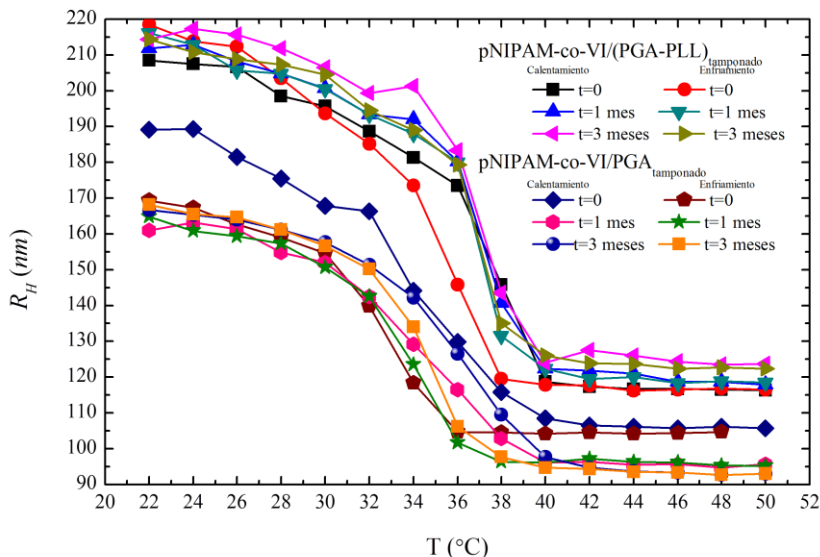


Figura 4.92 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución con fuerza iónica de 0.15M NaCl y tamponado a pH 7.4. Estabilidad temporal del microgel recubierto mediante la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento.

4.3 HÍBRIDOS

La formación de estos híbridos tiene como referencia principal los sistemas ya ideados por el grupo del profesor Frank Caruso con el objeto de conseguir nuevos microrreactores cuya aplicación principal es mimetizar una célula^[15, 214].

La metodología utilizada ha sido denominada aproximación *bottom-up* que consiste en obtener sistemas de encapsulación en los que se combinan moléculas grandes individuales para crear un complejo con función celular que está formado por el mínimo número de componentes^[403]. Se han desarrollado gran número de avances en lo que respecta a la formación de compartimentos, como son membranas lipídicas encerradas en moléculas activas^[404], lo cual proporciona la habilidad de generar funcionalidades específicas relevantes en funciones bioquímicas de procesos fisiológicos^[405, 406]. Las principales aplicaciones de esta metodología hasta ahora han sido en terapia génica y terapia enzimática, pero que abre el camino a dar más respuestas en el campo de la medicina^[407].

Los primeros sistemas desarrollados fueron denominados capsosomas^[214], formados por partículas de sílice, modificadas en el propio laboratorio con carácter catiónico que han sido recubiertas por polímeros y una primera capa de liposomas utilizando la técnica capa a capa^[408, 409]. Más adelante se desarrollaron capsosomas con varias capas de liposomas, los cuales quedan unidos gracias a la unión no covalente de los liposomas con polímeros modificados con un número determinado de unidades de colesterol, como es en el caso de PLL y PMA^[215]. El estudio de la adsorción se desarrolló en sustratos planos con técnicas de superficie y su viabilidad mediante varios ensayos celulares^[334, 410, 411].

Otro tipo de sistemas estudiados en este grupo fueron sistemas formados por compartimentos diferentes, es el caso de cápsulas poliméricas recubiertas además de una capa de nanocápsulas biodegradables, de forma que las nanocápsulas pueden ser utilizadas como bio-transportadores de diversos fármacos^[216, 412].

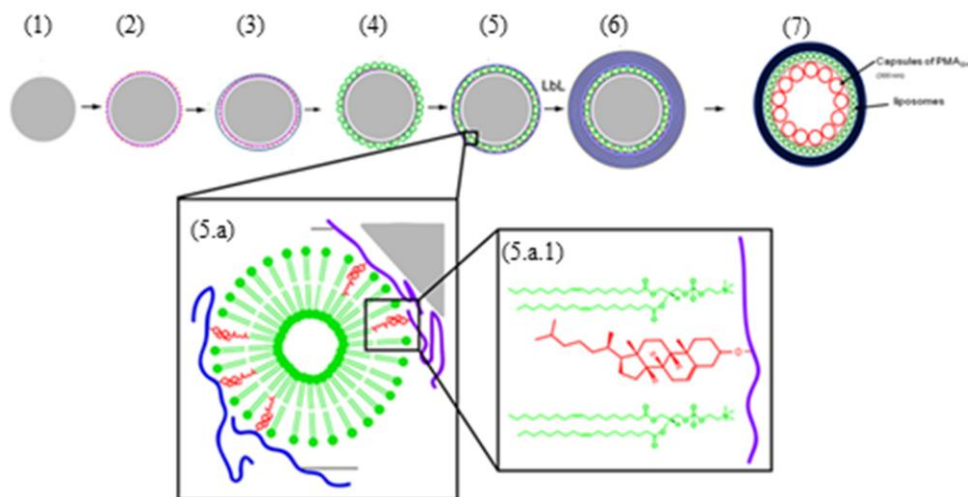


Figura 4.93 Método de obtención de los híbridos donde (1) preparación de partícula de sílice a pH 7, (2) adsorción de nanocápsulas poliméricas por interacciones electrostáticas, (3) capas de protección, se distinguen tres casos: PLL, PLL/PMA_c o PVP/PMA_c (4) adsorción de liposomas (5) capa de protección, PMA_c, (5.a) disposición de los polímeros si es el caso de dos capas de protección formadas por cadenas laterales de colesterol, (5.a.1) vista de cerca de la estructura que adoptan las cadenas de colesterol entre las cadenas de lípido (6) Adsorción capa a capa de los pares de polielectrolitos PMA_{SH}/PVP y entrecruzamiento con BM(PEG)₂ (7) Vaciado de la partícula dando lugar a los híbridos.

Con toda esta información previa, se desarrollaron los híbridos y los híbridos invertidos que consisten en la formación de una cápsula polimérica sobre la que queda adsorbida una capa de liposomas y otra capa de nanocápsulas biodegradables. Dos tipos de nano-transportadores que permitirán el transporte de dos enzimas, fármacos o sustancias diferentes con el objeto de poder desarrollar en el interior de la microcápsulas tanto reacciones químicas en cascada como en paralelo.

Como ya se ha comentado, la base de los híbridos son los capsosomas, por lo que el estudio se centró en la caracterización de la formación y no tanto en la estructura. Las capas previas a la capa de liposomas son PLL y el polímero modificado con cadenas de colesterol^[11], PMA_c; la denominada

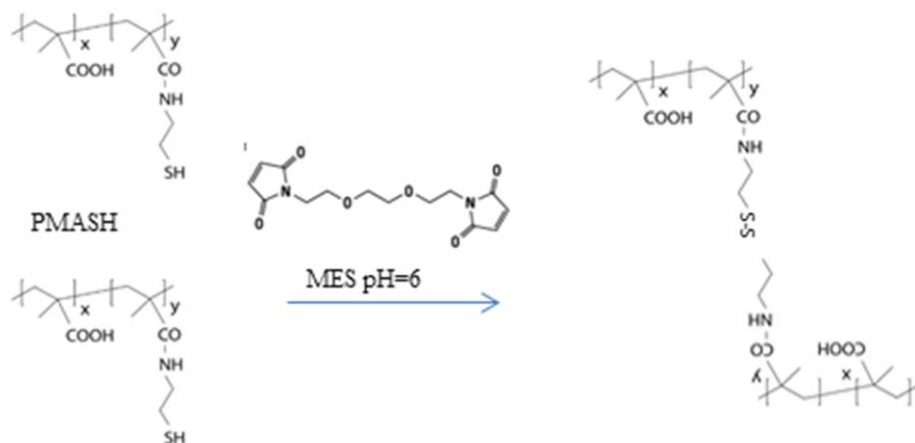


Figura 4.94 Entrecruzamiento realizado para dar lugar a enlaces disulfuro que proporciona al híbrido formado mayor estabilidad.

capa de sacrificio estudiada ha sido de PMA y PVP y posteriormente los polímeros ensamblados tras los liposomas fueron PVP/PMA_{SH}^[13], que fueron depositados un total de cuatro veces debido a que ya es conocido, con este tipo de sistemas el mínimo número de bicapas necesario para evitar la formación de agregados^[13, 209]. Los resultados que se exponen corresponden a la optimización de estos sistemas. La estructura de híbridos estudiados ha sido la que se muestra en la Figura 4.93. Y finalmente el entrecruzamiento se realizó de la forma mostrada en la Figura 4.94.

4.3.1 Citometría de Flujo

Se ha utilizado esta técnica para estudiar los sistemas formados^[413], con el fin de poder determinar la opción más viable tanto del tipo de liposoma a utilizar como del tipo de polielectrolito que confiera mayor estabilidad al sistema completo.

La disolución de partículas se introduce en el equipo mediante un sistema de aspiración que permite fijar la velocidad para que el flujo medido se mantenga constante durante todo el experimento. A medida que las partículas atraviesan el haz de láser, la trayectoria de la luz se ve interrumpida, de forma que parte es dispersada y es ésta luz dispersada la

que se recoge por los detectores situados a 180° y 90° de la luz incidente. Se recoge la dispersión perpendicular al haz de luz (FSC) y la dispersión paralela al haz de luz (SSC) y con ellas se puede obtener información de la concentración de la muestra analizada^[414].

En este caso van a ser los fluoróforos los que sean excitados por el láser, y esta fluorescencia se recoge por los filtros apropiados, en función de la longitud de onda requerida. Uno de ellos es Alexa flúor que acompaña a la capa de nano-partículas adsorbidas sobre la micro-partícula de sílice, y el otro fluoróforo es un lípido fluorescente, NBD-PC que corresponde al liposoma y que será medido en el momento en que se adsorben los liposomas.

Para comenzar el proceso de formación de los híbridos lo primero es conocer las concentraciones iniciales y con el equipo de citometría de flujo, esto se puede conocer. Para las partículas de sílice de $3\ \mu\text{m}$ se mide la cantidad de partículas por mL que se registran en el equipo que corresponde al valor de $3.19 \times 10^8\ \text{partículas} \cdot \text{mL}^{-1}$, para las nanocápsulas de PMA_{SH}/PVP es necesario el cálculo de la concentración cada vez que se vayan a utilizar ya que a pesar de ser sintetizadas de forma rigurosa, en cada muestra obtenida un pequeño cambio en el método de fabricación provoca variaciones muy grandes en la concentración final. Gracias a estudios previos realizados en el

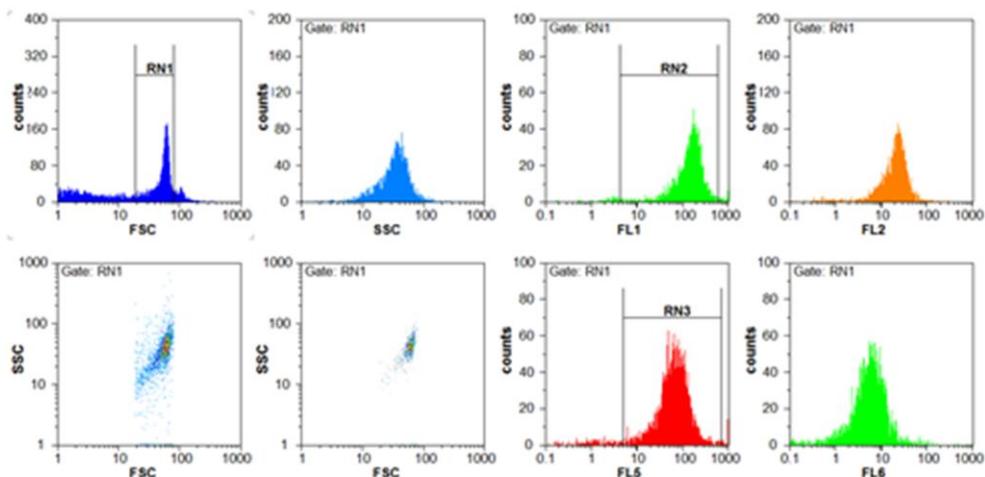


Figura 4.95 Resultados del citómetro de flujo tras introducir la muestra y fijar los parámetros estudiados en estos sistemas previamente.

grupo^[216], se sabe que una partícula de 3 μm adsorbe un total de 200 nanocápsulas de 300 nm y es con esta relación 1:200 con la que se trabaja en el proceso de formación de los híbridos. Para determinar el volumen de liposomas adsorbidos sobre la plantilla se parte de la información proporcionada en los estudios anteriores sobre capsosomas en los que determinaron que 8×10^3 liposomas^[15] en el volumen utilizado son suficientes para el recubrimiento total de una partícula de este tamaño.

Como en este caso se han adsorbido las cápsulas poliméricas de 300 nm previamente, se añade un exceso del volumen que se consideraba y así asegurar el recubrimiento completo que tras el proceso de centrifugación el exceso de liposomas es eliminado. Una vez obtenido el híbrido, las medidas han permitido obtener la intensidad fluorescente de más de 20000 partículas·mL⁻¹ y se obtienen medidas mostradas en la Figura 4.95.

Una vez obtenidos los datos para cada una de las muestras, se observan las combinaciones cuya intensidad fluorescente es mayor. La diferencia

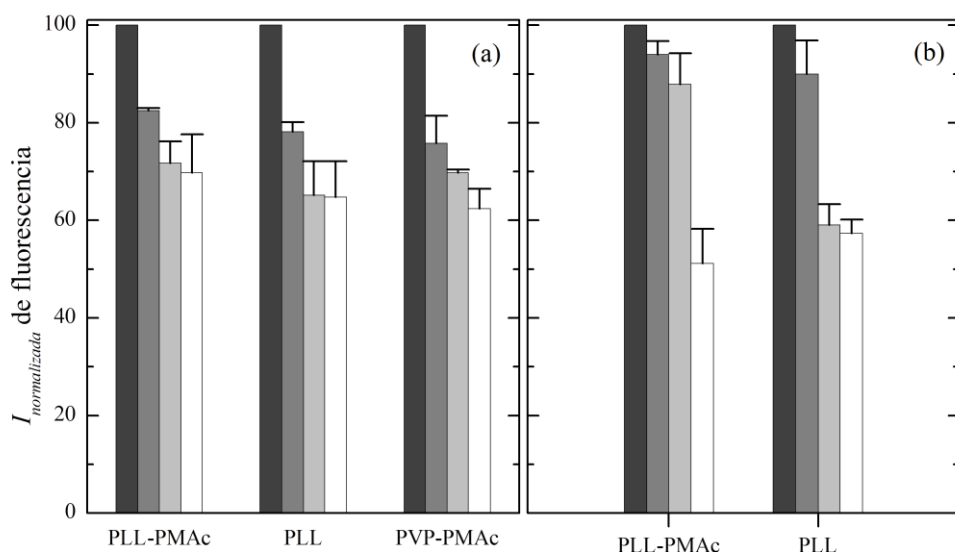


Figura 4.96 (a) Intensidad de fluorescencia en láser rojo tras el ensamblamiento de las cápsulas de 300 nm y (b) en láser verde, tras el ensamblamiento de los liposomas DMPC:DPPC (40:10); Las medidas se realizaron a 25°C y un volumen de 2 mL.

entre estas combinaciones es el tipo de lípido usado para cada uno de los sistemas, lo que permitió clasificarlos en función del lípido, es decir, saturado e insaturado. Ha sido interesante estudiar liposomas formados por lípidos insaturados ya que aportan importante información sobre la interacción liposoma-polímero^[334] pero si además se desea estudiar sus potenciales aplicaciones es mejor poder conocer cómo responden los liposomas saturados ya que son los más usados en aplicaciones de liberación de fármacos puesto que se aprovecha la temperatura de transición característica para facilitar la liberación de cualquier tipo de carga. Además, a temperatura ambiente y durante su almacenamiento los liposomas saturados poseen una estructura más rígida que evita la pérdida de la carga o al menos la minimiza si se compara con los liposomas insaturados que a la misma temperatura poseen una estructura más flexible.

En la Figura 4.96 se muestran las combinaciones realizadas para el liposoma formado por DMPC y DPPC en las cuales se ha buscado cual de ellas da mayor intensidad de fluorescencia en cuatro etapas del proceso: al

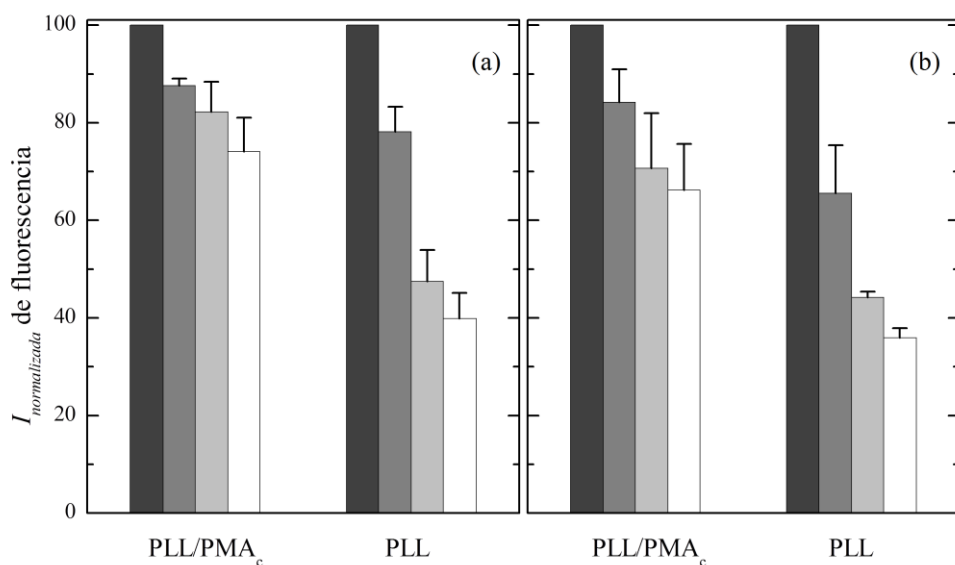


Figura 4.97 (a) Intensidad de fluorescencia en rojo tras el ensamblamiento de las cápsulas de 300 nm y (b) en láse verde, tras el ensamblamiento de los liposomas DOPC:DODAB (30:70); Las medidas se realizaron a 25°C y un volumen de 2 mL.

adsorber el liposoma, tras el proceso completo de adsorción de capas y finalmente tras la formación de la cápsula a pH 4.0 y a pH 7.0, Las medidas se han realizado para los dos fluoróforos con el fin de seleccionar aquella combinación óptima para ambos.

La única excepción es para el liposoma catiónico estudiado, DOPC:DODAB (70:30) el cual se ha utilizado en dos combinaciones ya que la combinación con el polielectrolito PVP no mostraba buenos resultados, de forma que se puede observar en la Figura 4.97.

Se desarrollaron estas combinaciones para todos los tipos de liposomas estudiados y al final se seleccionaron las combinaciones que más intensidad de fluorescencia mostraban y es lo que se muestran en la Figura 4.98 para la

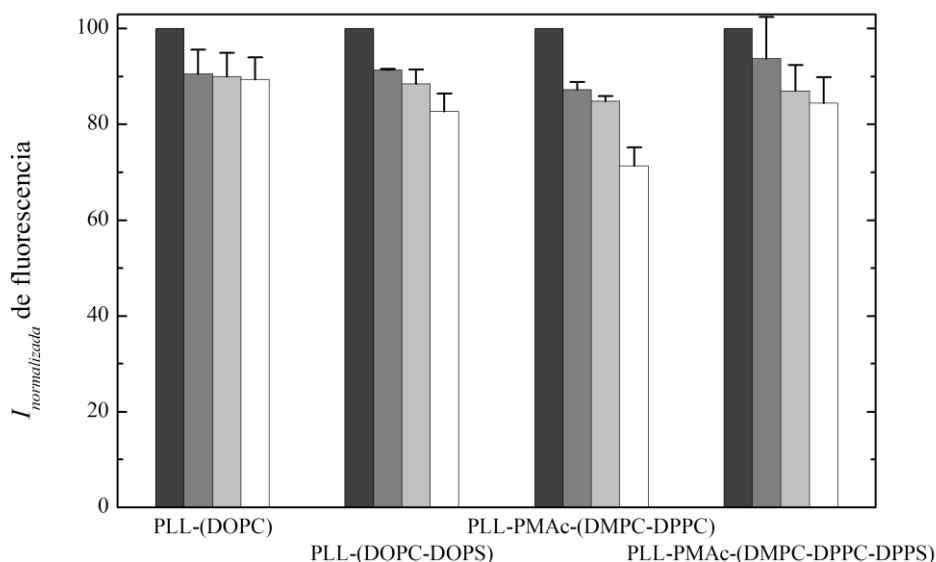


Figura 4.98 Intensidad de la fluorescencia con láser rojo, tras el ensamblamiento de las capsulas de 300 nm; Las medidas se realizaron a 25°C y con el mismo volumen total medido igual a 2 mL. La primera columna de la izquierda (más oscura) corresponde a la medida después de adsorberse las cápsulas de 300 nm; la segunda columna al momento en que se forma el *core-shell* a pH 4, la tercera columna es el híbrido tras el tratamiento ácido para disolver la partícula de sílice a pH 4 y la última columna (color blanco) corresponde al híbrido tras el tratamiento ácido pero a pH 7.4.

fluorescencia de las nanocápsulas adsorbidas y la Figura 4.99 para la fluorescencia debida a la adsorción de los liposomas.

Los datos expuestos corresponden primero a la intensidad de fluorescencia medida después de adsorber los liposomas; segundo, una vez adsorbidos los polímeros que protegen el híbrido completo, se denomina *core-shell*. Los datos finales corresponden al paso de la formación de la cápsula y medido a diferentes pH, 4 y 7. Esta lectura es importante y puede dar una idea de la estabilidad del sistema al variar el pH.

La adsorción de nanocápsulas, según se puede observar en la Figura 4.98 ha sido posible en todos los sistemas estudiados. El fluoróforo ha sido añadido en las nanocápsulas una vez formadas ya que se ha comprobado que antes de formar la cápsula se pierde mucha intensidad de fluorescencia ^[413].

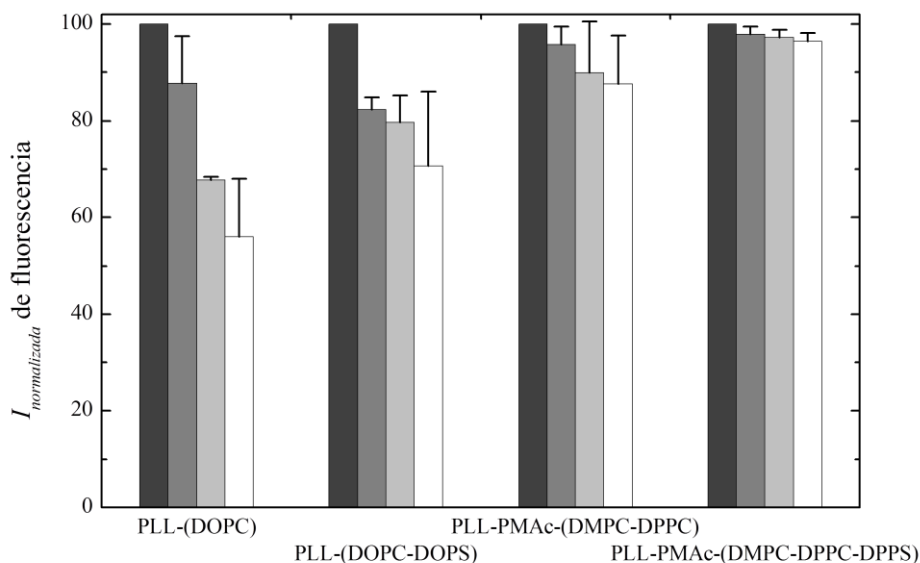


Figura 4.99 Intensidad de la fluorescencia con láser verde, tras el ensamblamiento de los liposomas. Medidas realizadas a 25°C y en un volumen de muestra igual a 2 mL. La primera columna de la izquierda (más oscura) corresponde a la medida después de adsorberse los liposomas; la segunda columna al momento en que se forma el *core-shell* a pH 4, la tercera columna es el híbrido tras el tratamiento ácido para disolver la partícula de sílice a pH 4 y la última columna (color blanco) corresponde al híbrido tras el tratamiento ácido pero a pH 7.4.

Las nanocápsulas han sido ensambladas directamente sobre la partícula de sílice, según el protocolo ya descrito en el capítulo de **Materiales y métodos** y para asegurarnos de dicho ensamblaje se observó por microscopio con el filtro adecuado además de ser medidos con el citómetro de flujo para comprobar la intensidad de fluorescencia antes de ensamblar los liposomas.

En los híbridos con lípidos insaturados se ha comprobado que la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar el número de capas de polímero. Por esta razón, el ensamblaje en estos híbridos posee una capa menos de PMA_c.

La mayor intensidad de fluorescencia obtenida fue para el sistema con liposomas saturados negativos, es decir, los formados por DMPC-DPPC-DPPS en todas las medidas de intensidad de fluorescencia.

El ensamblamiento de los liposomas, tal y como se observa en la Figura 4.99 ha sido posible en todos los sistemas estudiados. La confirmación de la adsorción de los liposomas sobre los polímeros estudiados ha sido posible, gracias a la microscopía que nos ha permitido observar, con el filtro adecuado, que los liposomas pasan a formar parte del híbrido que se está fabricando. En este caso, la señal de fluorescencia mayor ha sido observada para los liposomas formados por lípidos insaturados negativos. Finalmente, con ambos resultados, se puede decir que estos son los sistemas deseados para su posterior utilización en aplicaciones bio-médicas.

Las combinaciones que mejor respuesta mostraron son:

- PLL/(DOPC/NBD)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)₅
- PLL/(DOPC/DOPS/NBD)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)₅.
- PLL/PMA_c/(DMPC-NBD)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)₅
- PLL/PMA_c/(DMPC-DPPS-NBD)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)₅
- PLL/PMA_c/(DMPC-NBD)/PMA_c/PMA/PVP/(PMA_{SH}/PVP)₅.

Las cadenas laterales de colesterol que modifican el PMA permiten que los liposomas se adsorban manteniendo su forma intacta una vez que forman parte del híbrido, y al mismo tiempo es un anclaje para los liposomas que evita la desorción cuando estén afectados por cualquier cambio externo, sea pH o temperatura.

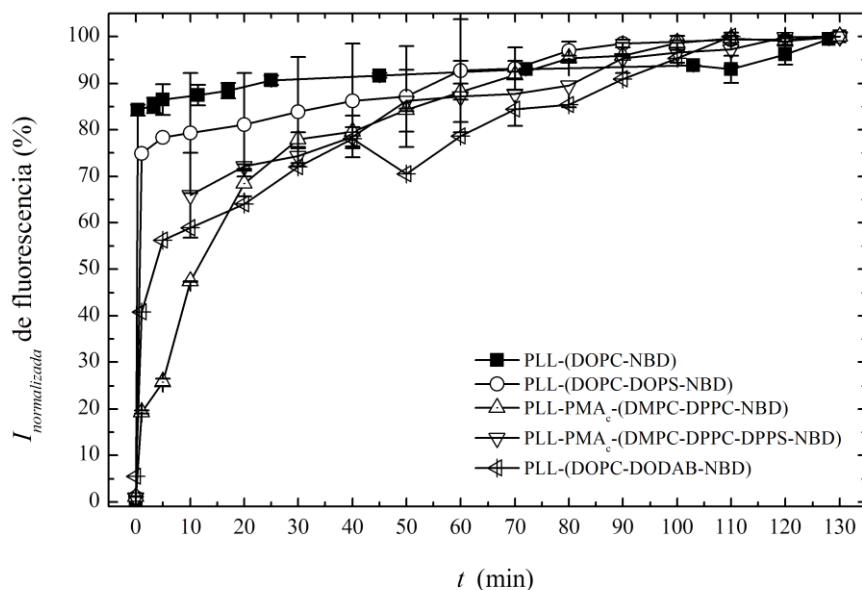


Figura 4.100 Isotermas a $T = 25^{\circ}\text{C}$ para distintas combinaciones medidas tras realizar la adsorción de los liposomas. Indica el tiempo necesario para que se asegure la adsorción completa de los liposomas sobre la superficie. Se ha añadido la isoterma para liposomas insaturados catiónicos para mostrar todos los casos estudiados.

En la Figura 4.100 se muestra la variación de la señal de fluorescencia en función del tiempo. Con estos datos es posible conocer el tiempo de adsorción de los liposomas sobre las partículas de sílice que llevan a su vez ensambladas las nanocápsulas poliméricas de 300 nm de tamaño. Para el caso de liposomas formados por DMPC es necesario calentar hasta 41°C durante el tiempo de adsorción, que suele oscilar de 40 a 60 minutos. La razón por la que se debe aumentar la temperatura para producirse su adsorción es conseguir que el lípido esté en la fase fluida tras sobrepasar la temperatura de transición que caracteriza al DMPC. La adsorción del lípido formado por DOPC se realiza muy rápido, casi a los diez minutos de poner en contacto los liposomas con la primera parte del híbrido, el 80% de los liposomas han sido adsorbido, aunque no es hasta pasados 60 minutos cuando se mantiene la intensidad de fluorescencia constante, indicando que ya se ha producido la adsorción completa. La isoterma correspondiente al

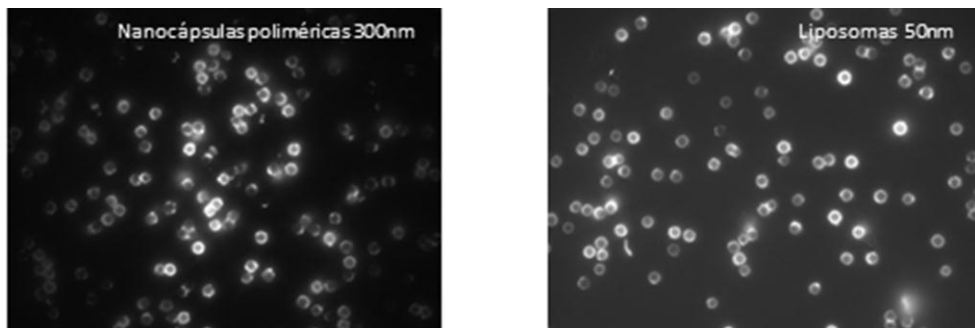


Figura 4.101 Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste en las que inicialmente se observa la adsorción de las cápsulas poliméricas y tras adsorber dos capas de polímeros, una de ellas con las cadenas de colesterol se adsorben los liposomas de 50 nm de diámetro. Todo este proceso se desarrolla a pH 4 en disolución tamponada.

híbrido con liposomas catiónicos es descartado para continuar los estudios con él debido al mayor tiempo de adsorción que supone al utilizarlos.

4.3.2 Microscopía óptica: Confocal y de contraste

La utilización de técnicas de microscopía en estos sistemas ha sido un gran apoyo para poder observar la adsorción de las distintas capas de liposomas y de nanocápsulas poliméricas sobre la partícula de sílice de 3 μm . Las nanocápsulas poseen AF-633 como fluoróforo que no interfiere con la fluorescencia emitida por los liposomas cuya sonda incorporada es NBD situado en la bicapa lipídica.

Se comienza con la adsorción de las nanocápsulas poliméricas para después ensamblar los liposomas. Mediante microscopía de contraste fueron observados y se muestran en la Figura 4.101.

El paso a la formación de la cápsula se realiza con el tratamiento ácido al híbrido completo pero en este caso, a diferencia de las nanocápsulas poliméricas, el tratamiento será menos agresivo y más rápido para evitar la ruptura de los sistemas formados.

Antes de obtener imágenes con el microscopio confocal, las pruebas iniciales de la formación de estos sistemas fueron obtenidas con un

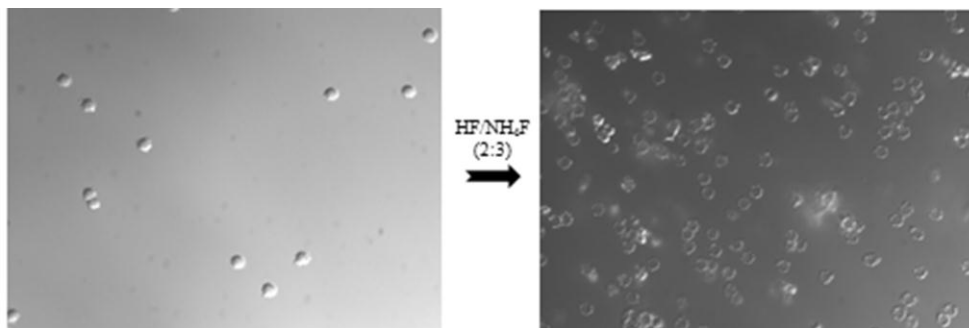


Figura 4.103 Imagen obtenida mediante microscopía de contraste, campo claro que muestra el paso de híbridos en forma de *core-shell* a cápsulas por el tratamiento ácido tamponado y tras el lavado con disolución tampón a pH 7.

microscopio de contraste. De esta forma, se confirmó, tras el tratamiento ácido que produce el vaciado de la partícula de sílice, la obtención del híbrido manteniendo su estructura de ensamblado de liposomas y de nanocápsulas poliméricas. En la Figura 4.103 se observa el vaciado para todas las partículas presentes. Se ha mostrado a pH 7 que los agregados disminuyen, y es una de las razones para continuar con los ensayos en búsqueda de posibles aplicaciones.

Las imágenes mostradas en la Figura 4.102 corresponden a híbridos en

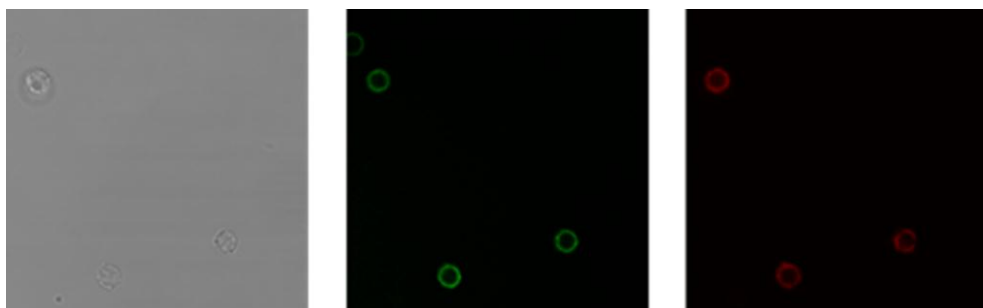


Figura 4.102 Imagen de Confocal de los híbridos con la primera capa de nanocápsulas poliméricas de PVP/PMA_{SH} (en rojo) y otra capa, tras varios polímeros sin sonda, de liposomas con NBD en la bicapa de los liposomas. Imágenes obtenidas a pH 7.4 en disolución tampón de HEPES 150 mM con una concentración de 10 mM NaCl. La temperatura de medida fue de 25°C.

pH fisiológico. Son necesarias al menos las tres bicapas poliméricas ensambladas, tras la adsorción de los liposomas, para evitar la agregación de estos sistemas tan complejos. Ha sido necesario hacer el entrecruzamiento entre el polímero modificado con grupos $-SH$ formando enlaces de sulfuros para que se mantenga intacto el híbrido. Este procedimiento de entrecruzamiento elegido es muy estable respecto a agentes externos evitando la pérdida de actividad funcional.

En la Figura 4.104 se observa el mismo sistema a pH 4 tras el vaciado de la partícula de sílice, la disolución es lavada con disolución tampón a pH 4 al menos tres veces y se observan híbridos que no sufren agregación a este pH.

Y ahora se muestran los primeros resultados obtenidos para híbridos invertidos. Los híbridos invertidos, de cuya síntesis se ha hablado en el capítulo de **Metodología** y cuyo método de preparación se detalla en la Figura 3.19, se muestran en la Figura 4.105. El pH de estudio en el que se encuentran es 7, al cual pueden ser más inestables estos sistemas. Se observa que los liposomas han sido ensamblados sobre la partícula de sílice, su tiempo de adsorción ha sido el mismo que se necesitó para los híbridos que se han desarrollado hasta ahora. Las cápsulas han sido ensambladas después, y se adsorben sin dar lugar a la agregación del sistema completo. El objeto de los híbridos invertidos es la obtención de un capsosoma más complejo, con los liposomas y la nanocápsulas embebidas en el interior de

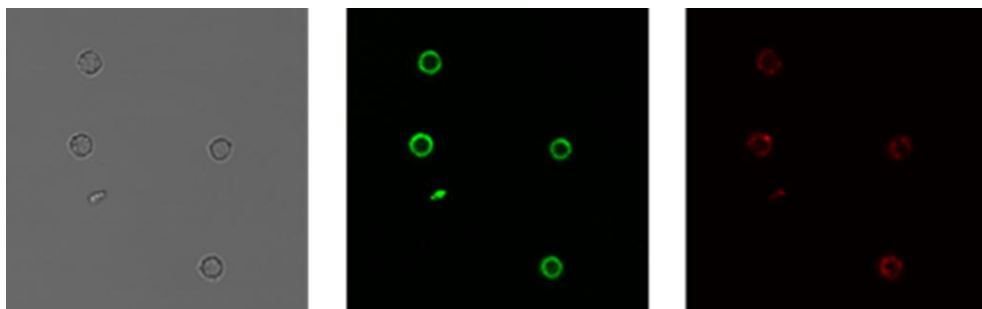


Figura 4.104 Imagen obtenida mediante CLSM de los híbridos que contienen como primera capa, adsorbida electrostáticamente, las nanocápsulas poliméricas de PMA_{SH}/PVP marcadas con Alexa-Fluor-633 y con otra capa, posterior a esta y tras dos capas de sacrificio, los liposomas de 50 nm de diámetro marcados con el fluoróforo NBD. Estas imágenes de los híbridos fueron tomadas en disolución tampón a pH 4.

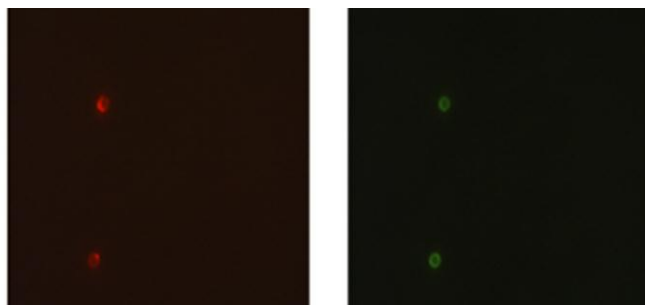


Figura 4.105 Imagen obtenida mediante Microscopía de contraste (DIC) de híbridos invertidos, conteniendo en primer lugar los liposomas marcados con el fluoróforo NBD y como capa más externa, las nanocápsulas poliméricas de PMA_{SH}/PVP marcadas con Alexa-Fluor-633 y todo ello en disolución tampón a pH 7 en la etapa de *core-shell*. Se muestran formas esféricas y partículas no agregadas.

la cápsula polimérica y es lo que aparentemente se tiene, ya que no se observan anillos alrededor de la cápsula polimérica sino que la cápsula queda completamente coloreada de verde o de rojo indicando que a este pH ambos nano-contenedores están en el interior del sistema.

Estos resultados iniciales son prometedores y es necesario continuar investigando estos sistemas ya que son potencialmente útiles en reacciones en cascada y son un paso más en la mimetización de sistemas celulares.

4.3.3 Microscopía electrónica de transmisión

Una vez se han caracterizado estos sistemas con las dos técnicas anteriores, se ha explorado la posibilidad de obtener información estructural de estos sistemas mediante la utilización de la microscopía electrónica. La preparación de la muestra ya se ha explicado en el capítulo de **Técnicas experimentales**, de esta forma, lo primero es agitar la muestra con ayuda de un vórtex, se depositan gotas de la disolución en la que se encuentran los híbridos a un pH 7.4 sobre una plantilla de cobre recubierto de carbono y se deja secar.

En la Figura 4.106 se observan una cápsula polimérica rodeada de liposomas que corresponden a las zonas más oscuras de la imagen y las nanocápsulas poliméricas de 300 nm que corresponden a la zona clara que

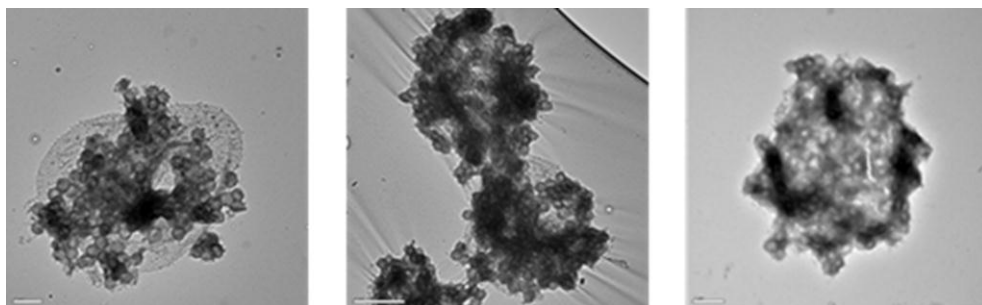


Figura 4.106 Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) de una cápsula polimérica con liposomas y nanocápsulas poliméricas alrededor a un pH 7.4. La escala es de 1 μm .

rodea la cápsula polimérica y que quedan delimitadas por el polímero que forma parte de la cápsula y que da el color más oscuro en la imagen. Se observa una gran densidad de ambos tipos de partículas alrededor de la cápsula polimérica, lo que confirma la formación de estos sistemas y asegura que los liposomas y las nanocápsulas poliméricas están intactas, sin modificación de forma cuando son adsorbidas para formar una capa adicional en los híbridos. El análisis de las imágenes proporciona un tamaño del híbrido de 3.8 μm , debido principalmente a las partículas de sílice (3 μm) sobre las que se adsorben los liposomas de 50 nm y las cápsulas poliméricas de 300 nm.

4.3.4 Ensayos de liberación

Liberación de β -lactamasa

Para la detección de β -lactamasa se han desarrollado muchos métodos pero el más inmediato y visual es el que se ha utilizado. Este método se basa en la reacción colorimétrica que tiene lugar cuando se pone en contacto el sustrato, la nitrocefina, y la enzima.

La técnica utilizada para seguir la reacción enzimática es espectroscopía UV-Visible. El equipo en el que se ha medido la absorbancia se denomina Nanodrop ND-1000: es un espectrofotómetro utilizado para medidas donde la cantidad de muestra necesaria es de 1 μL de la disolución con una

concentración máxima de 3700 ng/ μ L, no requiere el uso de cubeta y la medida es rápida, conseguida en un máximo de 10 segundos^[415].

El ensayo enzimático se ha realizado con un solo tipo de liposoma, el formado por DMPC-DPPC-NBD/PC. Este tipo de liposoma fue el utilizado en el ensayo enzimático realizado en capsosomas^[334] por lo que es posible comparar los resultados. Se ha comprobado que estos liposomas son capaces de atrapar la β -lactamasa durante el proceso de formación de los mismos, y una vez dentro, la enzima puede ser liberada al aumentar la temperatura por encima de la temperatura de transición del lípido que hace que la bicapa cambie a un estado fluido.

En dichos liposomas se va a incorporar β -lactamasa. Así pues, se formará la película de DMPC-DPPC-NBD (40:10:40) y es en el momento de la disolución cuando se añadirá para que quede atrapada en el interior del liposoma.

Se prepara una disolución de 3 mg/ml de β -lactamasa en HEPES. Se añaden 200 μ L de esta disolución a la película de lípidos, con un previo calentamiento a 37°C. Si no se disolviera la película seguir calentando sin sobrepasar la temperatura de 37°C, debido a que la enzima puede desnaturalizarse y no poseer la actividad suficiente para que pueda ser desarrollado el ensayo enzimático. Se calienta agua hasta 37°C y es en este baño donde mejora la disolución de la película. Se disuelve prácticamente toda la película y entonces se añaden 800 μ L de disolución tampón HEPES a pH 7.4. En este momento se realiza la extrusión con una membrana de tamaño de poro 50 nm. Una vez formados este tipo de liposomas se procede a formar el híbrido de la forma expuesta en el capítulo de **Metodología**.

Para los híbridos utilizados en los ensayos de liberación se ha sustituido el HF 5 M utilizado para la disolución del *core* de sílice, por una mezcla HF/NH₄F (2:3). Las disoluciones acuosas de esta mezcla presentan pH 5 con lo que se evita la desnaturalización de la enzima encapsulada. Tras el procedimiento de la formación del híbrido se obtuvo un volumen final de 20 μ L.

El procedimiento utilizado en estos ensayos de liberación fue el siguiente: se preparó una disolución de 45 μ L de tampón de fosfato 0.1 M (pH 7.4) y 5 μ L de nitrocefina en PBS 0.1 M (pH 7.4) de concentración 500 mg·mL⁻¹. A la mezcla anterior se añaden 5 μ L de la disolución de híbridos (corresponde a la lectura en el citómetro de flujo de

$1.56 \cdot 10^6$ cuentas/ μL) a pH 7, se preparan tres tubos, dos de control y el tercero en donde se producirá la reacción y se calientan a temperatura constante de 37°C . Los tubos de control contienen híbridos donde no se ha encapsulado β -lactamasa y tiene color amarillo debido a la disolución de nitrocefina, mientras que el tercer tubo contiene híbridos con β -lactamasa encapsulada y adopta una coloración rojiza, cuando esta es liberada y se produce la reacción enzimática con la nitrocefina dando un producto de reacción que presenta un máximo de absorción a 492 nm.

Las medidas cuantitativas de absorción en función del tiempo a 492 nm se han realizado en el Nanodrop. El control de liberación total de β -lactamasa se realiza mediante la adición del tensioactivo no iónico Tritón X-100 que promueve la degradación de la membrana del liposoma y por tanto la liberación total del material encapsulado. El procedimiento consistió en la adición de 2 μL de Tritón X-100 al 10% w/w sobre la disolución de híbridos manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Todos los experimentos se han realizado por triplicado y con muestras recién preparadas. La reacción enzimática ha sido, previamente, ensayada con sistemas simples de liposomas y se ha comprobado que no se produce a una velocidad apreciable a temperatura ambiente.

La Figura 4.107 muestra medidas cuantitativas de la variación de absorbancia a 492 nm, con el tiempo, se observa cómo la adición de Tritón X-100 produce en dos horas la liberación total de la enzima encapsulada, la caída posterior de absorbancia es consecuencia de reacciones posteriores que tienen lugar a partir del producto de hidrólisis de la nitrocefina. Las otras dos medidas que se muestran sirven de control y corresponden a una muestra con enzima encapsulada y sustrato en ausencia de tensioactivo y otra muestra sin enzima encapsulada.

Adicionalmente podemos decir a partir de estos ensayos que la actividad de la β -lactamasa ($M_w=31.000$ Da), enzima que presenta un punto isoelectrico de 6.1 no se ve afectada por las capas poliméricas añadidas a los híbridos, tras la adsorción formadas tras ensambla de los liposomas cargados con la enzima, en la formación del capsosoma. Esto indica que la encapsulación de la enzima ha sido eficiente y que los liposomas permanecen intactos en el proceso posterior de fabricación del híbrido, puede ser realizado por efecto de la temperatura o por la adición de un tensioactivo.

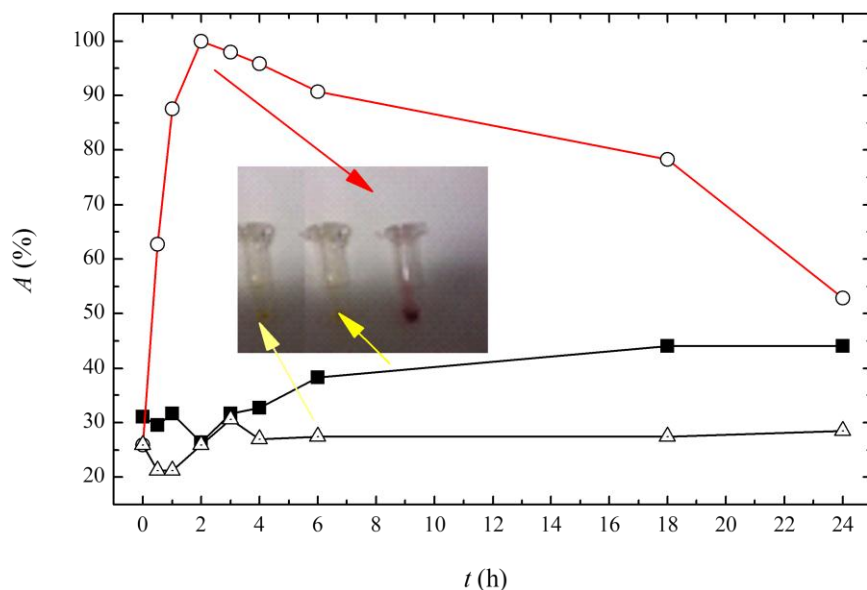


Figura 4.107 Representación de la absorbancia a 492 nm frente al tiempo que corresponde a la longitud de onda a la que el producto de la reacción enzimática absorbe. Un control negativo es aquel en el que los liposomas están en disolución con el surfactante pero no poseen en el interior la enzima y otro control negativo que corresponde a liposomas con la enzima pero sin la presencia del surfactante. En la centro de la gráfica se observa (a) que es la muestra control de liposomas con enzima en presencia del sustrato sin Tritón X-100, (b) es la muestra sin enzima, en presencia del sustrato al que se le añade Tritón X-100 y (c) la muestra con liposomas con enzima encapsulada que lo liberan al añadir Tritón X-100 dando lugar al cambio de color a rojo y al aumento de absorbancia.

Degradación de cápsulas de 300 nm

Una vez estudiada la eficiencia de los liposomas dentro del híbrido formado se da paso a los estudios realizados sobre las nanocápsulas adsorbidas sobre la partícula de sílice y que forma la primera capa que la rodea. Para ello se ha buscado la posibilidad de degradarlas cuando forman parte del sistema de híbridos. Si esto es posible, cabe la posibilidad de introducir un fármaco, enzima,...actuando como otro tipo de transporte, distinto a los liposomas dentro de un mismo sistema.

Las nanocápsulas han sido entrecruzadas con un agente oxidante, cloramina-T, CAT, con el objeto de conseguir nanocápsulas fácilmente degradables. El ensayo de degradación consiste en utilizar un agente reductor, en este caso, glutatona, GSH^[416], que rompe los enlaces disulfuro formados tras el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas de PMA.

El procedimiento utilizado en este caso fue el siguiente: se preparó una disolución de GSH 1 M en NaOH 1 M y se tomó una alícuota de 1 mL para diluirla en PBS hasta obtener una concentración final de 5 mM. En esta disolución se añadió 5 μ L de híbridos y fue calentada a 37°C durante 12 horas. Para llevar a cabo un control se preparó una muestra de híbridos en disolución tamponada PBS y se calentó a la misma temperatura y durante el mismo tiempo.

Las medidas cualitativas de la variación de la intensidad de fluorescencia se han realizado en el citómetro de flujo para mostrar la disminución de la señal de fluorescencia con el tiempo; Cuando los híbridos entran en contacto

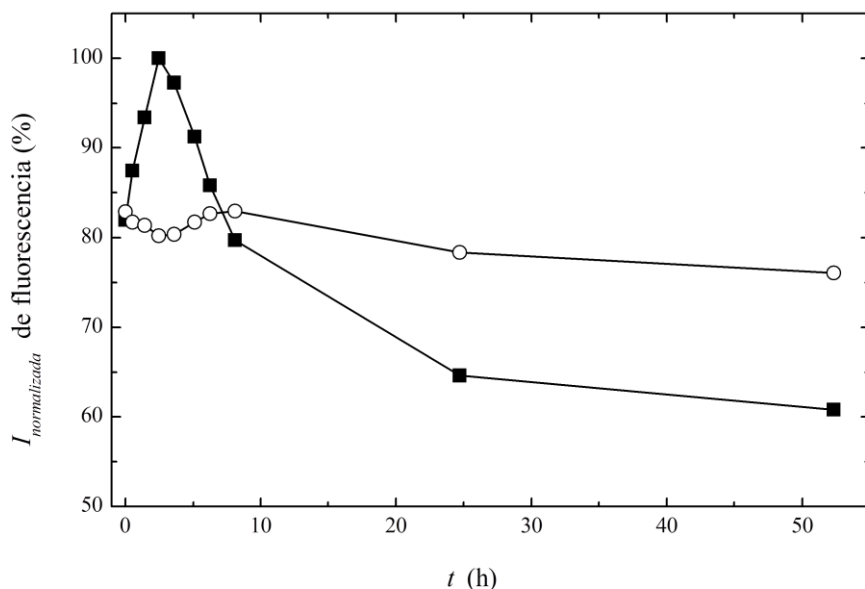


Figura 4.108 Intensidad de fluorescencia en función del tiempo para el proceso de degradación de las cápsulas de 300 nm formadas por PMA_{SH} y PVP en pH 7.4, donde se muestra el máximo de intensidad tras su degradación (■) y los datos de la muestra control que es la disolución de híbridos sin la presencia de GSH(○).

con el agente reductor se produce una reducción de los enlaces disulfuro y provoca la desorción y desaparición de las cápsulas de 300 nm dando lugar a un valor máximo de intensidad de fluorescencia que corresponde a la cantidad total de cadenas poliméricas con señal de fluorescencia que ya no forman parte de las cápsulas porque éstas han sido degradadas. Parte de estas cadenas quedan dentro de la estructura del híbrido, el resto sale y queda en la disolución y dando lugar a una mayor señal de fluorescencia.

En la Figura 4.108 se muestra la intensidad de fluorescencia con el tiempo para el canal de absorción de la sonda fluorescente AM-633, que es la que acompaña a las cápsulas de 300 nm. Se ha considerado tiempo cero a

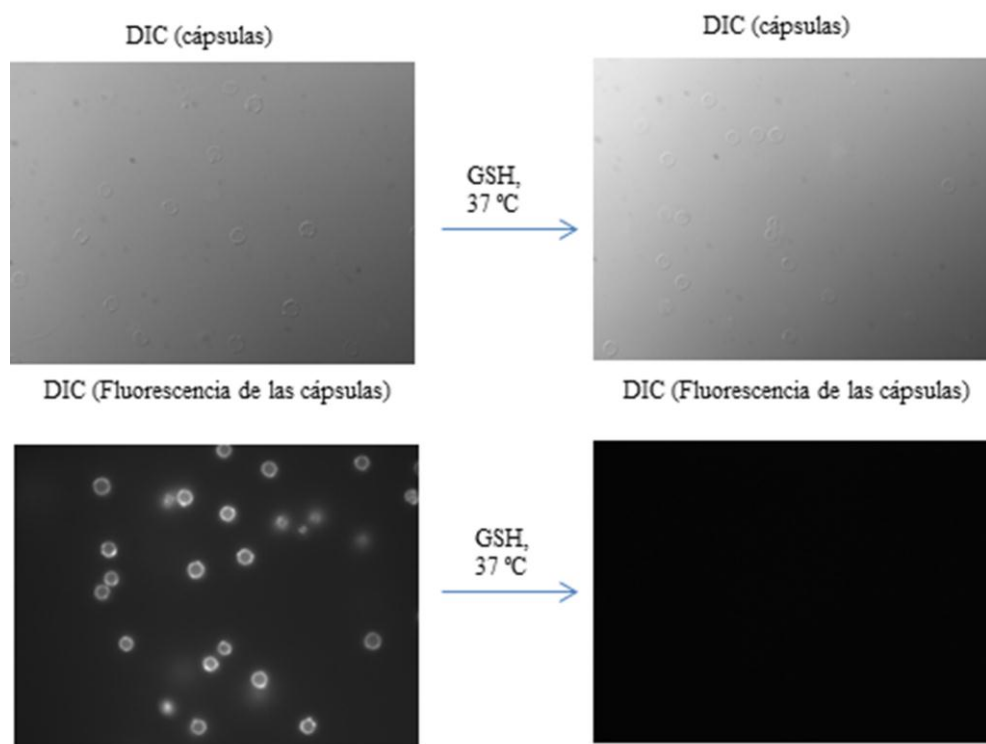


Figura 4.109 Micrografías obtenidas con cámara en blanco y negro de los híbridos antes y después de la reacción con GSH como prueba de la desorción de las nanocápsulas del complejo completo híbrido. Imágenes de arriba fueron tomadas sin excitar la fluorescencia de las nanocápsulas de 300 nm y las imágenes de abajo se tomaron excitando el fluorocromo que poseen dichas nanocápsulas.

la medida de las muestras antes de empezar la incubación a 37°C, se tomaron datos durante el tiempo de incubación y ya el último punto es después de 12 horas a esa temperatura. Se realizaron medidas en el canal en el que los liposomas absorben y se observó que el valor de la señal de fluorescencia para ellos no variaba con el tiempo.

Finalmente con ayuda de la microscopía de contraste se ha podido observar un cambio en la morfología del híbrido al entrar en contacto con la GSH, tal y como se muestra en la Figura 4.109.

Se ha observado que la degradación de las nanocápsulas poliméricas ha ocurrido pero transcurrió lentamente debido a que los liposomas han actuado como una barrera que no deja pasar al agente reductor que actúe sobre las cápsulas. Por esta razón se está trabajando en la degradación de las mismas en el sistema pero para el caso de los híbridos invertidos donde los liposomas se sitúan antes que las nanocápsulas y así desarrollarse la degradación como se espera y como se desarrolló en estudios anteriores^{[415][413][412][405]}.

5 CONCLUSIONES

La principal finalidad de este trabajo fue poner a punto un método de fabricación de liposomas unilamelares monodispersos y desarrollar el proceso de recubrimiento de los mismos mediante polielectrolitos de diferente naturaleza. El estudio de los parámetros que afectan a su estabilidad y los ensayos realizados posteriormente para probar su funcionalidad nos ha llevado a conseguir unos sistemas con potenciales aplicaciones en liberación de fármacos y enzimas.

El método elegido para la fabricación de los liposomas fue la extrusión, con el fin de obtener liposomas unilamelares y suficientemente monodispersos. El tamaño de poro de la membrana utilizada fue principalmente de 100 nm, las primeras muestras fueron obtenidas con el mini-extrusor manual, pero la necesidad de mayores volúmenes para un estudio detallado de estos sistemas condujo a la utilización de un extrusor de alta presión con mayor capacidad (10 mL). Con este método la polidispersidad de las muestras es mucho menor y se obtienen valores de $PDI < 0.1$ después de alrededor de 20 extrusiones para cada muestra. La optimización fue seguida a través de la técnica de dispersión de luz, observándose que a medida que aumentaba el número de extrusiones, disminuía el PDI hasta llegar a un valor constante.

Esencialmente se utilizaron liposomas catiónicos formados por mezclas del fosfolípido DOPC y el surfactante bicatenario catiónico DODAB. La densidad de carga superficial del liposoma viene determinada por el contenido de DODAB y por ello se estudiaron distintas composiciones, observándose que a partir de un porcentaje relativamente pequeño de DODAB, alrededor de un 15%, el valor del potencial zeta se muestra invariable y estable a pesar de seguir aumentando el porcentaje de surfactante dentro del sistema. Se ha optimizado la fabricación de este tipo de liposomas y caracterizado los distintos sistemas en cuanto a sus propiedades y estabilidad, adicionalmente se ha utilizado un método de determinación de contenido total en fósforo para determinar cantidades lipídicas totales en disolución y por tanto pérdidas en los procesos de extrusión.

El método de obtención de los liposomas, una vez optimizado se extendió para el estudio de liposomas con otras características. Liposomas formados por lípidos zwitteriónicos saturados como el DPPC y el DMPC, lípidos zwitteriónicos insaturados como el DOPC, mezcla de lípidos saturados para formar liposomas negativos como DMPC:DPPC, DPPC:DPPS:DMPC,

mezcla de lípidos insaturados para formar liposomas negativos como DOPC: DOPS, liposomas con lípidos modificados con cadenas de polímero como DMPC:DMPE_PEG de diferente peso molecular.

En el caso de liposomas zwiteriónicos se estudió cómo afectaba el pH al potencial zeta y al tamaño para buscar la situación más estable para estos sistemas. Para liposomas formados por lípidos modificados con cadenas de PEG también se estudió el efecto del pH pero principalmente el efecto de la temperatura en el tamaño de los mismos. Estos agregados lipídicos pegilados son una prometedora clase de membranas para la liberación de fármacos, el PEG estabiliza al liposoma y prolonga el tiempo de residencia en la circulación sanguínea.

Tras caracterizar los liposomas estudiados se realizó un estudio del recubrimiento capa a capa de los mismos utilizando distintas parejas de polielectrolitos. Conviene señalar que los estudios realizados confirman el aumento de estabilidad de los liposomas tras el recubrimiento, incluso con tan solo una capa.

El primer sistema estudiado fue el recubrimiento capa a capa de las plantillas de liposomas catiónicos con el par de polielectrolitos PSS/PAH. El número de capas máximas fueron ocho y se estudiaron cada uno de los sistemas intermedios mediante dispersión de luz y movilidad electroforética. El método puesto a punto para el recubrimiento del liposoma se basa en eliminar el exceso del complejo inter-polielectrolito que se forma mediante ciclos de centrifugación. Su viabilidad se confirmó con medidas de dispersión de luz que indican que la pérdida de liposomas en los procesos de centrifugado es mínima, que no se observa agregación y por tanto la muestra se mantiene monodispersa, con el correspondiente aumento de tamaño debido a las sucesivas capas adsorbidas.

Los datos de dispersión de luz indican que el crecimiento de las capas es esencialmente lineal y alternado, de forma que para las capas del polielectrolito aniónico, PSS, se obtuvo un espesor promedio de 10 nm y para el catiónico, PAH, un poco menor del orden de 4 nm. La inversión de carga, obtenida mediante la técnica de movilidad electroforética, indica la eficacia del proceso del recubrimiento y permite determinar las cantidades necesarias de polielectrolitos para el recubrimiento total.

Del estudio de la relación potencial zeta/tamaño, en términos del potencial de Velegol-Twar se desprende que todas las muestras preparadas

están dentro del intervalo de estabilidad. Tanto los sistemas plantilla, liposoma formados por DOPC/DODAB sin recubrimiento, como los sistemas recubiertos, incluso con tan solo una capa. La adsorción de partículas de látex sobre la superficie del liposoma, formando estructuras tipo coloidosoma mejora la estabilidad de los sistemas con valores de potencial zeta cercanos a los valores que se obtienen para las partículas en disolución.

El segundo sistema más estudiado es el formado por el par de polielectrolitos dependientes del pH, PGA/PLL que fueron utilizados para recubrir liposomas formados por DOPC dando lugar a liposomas con carácter dependiente del pH, y DOPC/DODAB cuya densidad de carga es independiente del pH mediante la técnica capa a capa. Para el sistema con el liposoma formado por tan solo DOPC, se hicieron dos estudios paralelos, en uno de ellos se utilizó como primera capa PEI, que mejora la adsorción de las posteriores capas de PGA/PLL para ambos sistemas. Los datos de dispersión, en los tres casos, indican la misma tendencia en el crecimiento de las capas que recubren los liposomas, pero difiere en los valores obtenidos para los espesores de las capas. Para el sistema formado por el liposoma de DOPC/DODAB, el recubrimiento con el polielectrolito aniónico, PGA, dio lugar a un espesor promedio de 12 nm y para el catiónico, PLL, de 4 nm. En el sistema formado por el liposoma de DOPC, el espesor para todas las capas, sea PEI, PGA o PLL es del orden de 10 nm.

El sistema de liposomas de DOPC/DODAB fue caracterizado mediante otras técnicas de dispersión, en este caso son SANS y SAXS que desde un punto de vista físico, dieron información complementaria a lo aportado por las técnicas de dispersión a ángulos altos. Con ambas técnicas se determinó el espesor de la bicapa del liposoma que corresponde a valores de 4 nm y se confirmó de nuevo el tamaño obtenido por las otras técnicas. Para la determinación de estos datos se aplicó el modelo de esfera hueca y la ley de Guinier a bajos ángulos lo que dio lugar a una concordancia en los resultados.

El estudio de estos sistemas formados por DOPC/DODAB y por DOPC fue ampliado mediante dos técnicas de superficie, la balanza de cuarzo y elipsometría de forma que en este momento se comenzó a tratar con sistemas planos. El objeto de este estudio es obtener más información sobre la adsorción de los liposomas sobre sustratos planos; a su vez determinar el porcentaje de agua que queda atrapado en la bicapa lipídica y en las

posteriores capas de polielectrolitos adsorbidos sobre dicha bicapa. Se observó que la adsorción y formación de la bicapa lipídica sobre el sustrato plano depende de la naturaleza del mismo; mientras que para sustratos de oro la formación de la bicapa es más rápida, para el silicio es mucho más lenta. Para la formación de la parte polimérica de la multicapa, existe un patrón de adsorción con un efecto par-impar más o menos acusado pero observado con ambas técnicas y para los dos tipos de sistemas. Este hecho nos permite determinar la cantidad de agua absorbida en ambos casos y que corresponde a valores entre el 50-90 % a lo largo de las distintas fases del crecimiento estudiadas para el caso del sistema formado por PSS/PAH y de un 30-50% para el caso de los biopolímeros PGA/PLL. En el primer caso, la cantidad de agua adsorbida decrece al aumentar las capas, lo que se atribuye a una compactación de las capas, algo que no ocurre para el segundo sistema que mantiene el mismo % durante todas las capas adsorbidas.

El estudio desarrollado para el microgel de carácter catiónico dependiente del pH y de la temperatura, p-(NIPAM)-co-VI comenzó desde la síntesis del mismo en el laboratorio hasta la adsorción alternada mediante la técnica capa a capa del par de polielectrolitos dependientes del pH, PGA/PLL, también utilizado en los liposomas y además el par PSS/PDADMAC. La elección de esta nueva plantilla y la obtención de resultados relevantes confirman la confianza puesta en la técnica capa a capa utilizada en todos los sistemas. El uso del microgel permite superar algunas limitaciones que se pueden presentar con los liposomas referidas a estabilidad.

Para este caso, microgeles con recubrimientos, de nuevo las técnicas de dispersión de luz y potencial zeta confirman la adsorción de los polielectrolitos sobre el microgel de carácter catiónico y se observa el efecto par-impar en el total de las capas adsorbidas sobre el mismo.

El posterior desarrollo de estructuras más complejas en las que los liposomas forman parte jugando el papel de nano-reactores nos ha ampliado las posibilidades en cuanto a sus aplicaciones. La formación de estructuras más complejas comienza con el recubrimiento de liposomas con nanopartículas de poliestireno o látex, el recubrimiento de partículas de látex con liposomas, el recubrimiento de liposomas con homopolímeros, formación de híbridos en los que los liposomas y nanocápsulas poliméricas son capas que recubren la partícula de sílice. Los híbridos, un sistema derivado de los capsosomas, fueron estructurados con una primera capa de

nanopartículas poliméricas, capas de polímeros intermedias para posteriormente adsorber los liposomas y finalmente recubrir el conjunto con bicapas de PMA_{SH}/PVP para obtener una microcápsula con diferentes nanotransportadores en su interior. Los ensayos desarrollados para comprobar la funcionalización de estos sistemas fueron la encapsulación de un enzima en el interior del liposoma y la posterior degradación de la nanocápsula. A través de estos ensayos se observó el potencial que poseen para futuras aplicaciones.

6 CONCLUSIONS

The main purpose of this work was the development of a method of producing monodisperse unilamellar liposomes and to coat them using a newly developed coating process using polyelectrolytes of different nature. The study of its stability and the later trials to test their functionality has led us to get a system with potential applications in drug delivery.

The method chosen for the fabrication of liposomes was extrusion technique for obtaining unilamellar and sufficiently monodispersed liposomes. The pore size of the membrane used was mainly 100 nm, the first samples were obtained with the mini-extruder, but the larger volumes needed for a detailed study of these systems led to the use of a high pressure extruder with greater capacity (10 mL). With this method the polydispersity index (PDI) of the samples got was much lower with $PDI < 0.1$ after about 20 extrusions for each sample. The optimization was followed by dispersion light scattering, showing that when we increased the number of extrusions, the PDI decreased until it reached a constant value.

Cationic liposomes were used essentially and they consist in mixtures of phospholipid 1,2-dioleoyl-glycero-phosphocholine, DOPC, and the cationic surfactant dioctadecyldimethylammonium bromide, DODAB. The surface charge density of the liposome is determined by the content of DODAB. Therefore different compositions were studied, showing that after a relative small percentage of DODAB, about 15%, the value of the zeta potential is shown unchanged and stable despite the further increase in the percentage of surfactant in the system. This system was optimized and characterized for the different techniques and their stability properties were verified. Additionally we used a method to calculate the total phosphorus content to estimate the total lipid quantities in solution and thus the losses in the extrusion process.

The method of production of the liposomes was extended to other systems. Liposomes composed of saturated lipids as DPPC and DMPC, zwitterionic lipid such as DOPC, saturated lipid mixture to form liposomes negative as DMPC: DPPC, DPPC: DPPS: DMPC, unsaturated lipid mixture to form liposomes negative as DOPC: DOPS, lipid modified with polymer chains as DMPC: DMPE-PEG of different molecular weight. All of them showed in Figura 3.1.

Zwitterionic liposomes were studied to find the most stable situation for these systems, so we studied how pH affected zeta potential and size. For lipid-modified liposomes formed with poly-ethyleneglycol, PEG chains we

also studied both the effects of temperature (mainly) and pH on liposomes size. These aggregates are a promising pegylated lipid class of membranes for drug delivery; PEG chains stabilize the liposomes and it prolongs the residence time of the liposomes in the bloodstream.

After characterizing the studied liposomes, a study of the coating layer – by-layer browsed with different pairs of polyelectrolytes. This confirmed the increased stability of the liposomes after coating, even with just one layer.

Cationic liposomes, DOPC:DODAB was the first system studied. This system was used as a templates for covering the liposomes with polyelectrolytes poly(styrenesulfonate) sodium salt / poly(diallyldimethyl ammonium), PSS/PAH. The maximum number of studied layers by light scattering and electrophoretic mobility was eight. The developed method for coating the liposome was based on eliminating the excess of the inter-polyelectrolyte complex formed by centrifugation cycles. Their viability was confirmed by light scattering measurements which indicated that the loss of liposomes in the centrifuge process was minimal. There was not observed aggregation, therefore the sample remains monodisperse with a corresponding increase in size due to successive adsorbed layers.

The light scattering data indicated that the growth of the layers was essentially linear and alternated. We obtained an average thickness of 10 nm for the anionic polyelectrolyte layers (PSS), and for the cationic polyelectrolyte poly-allylamine hydrochloride (PAH) slightly less than 4 nm thicknesses. The charge reversal obtained using the electrophoretic mobility technique was indicatived the coating process efficacy and it made possible to determine the quantities of the polyelectrolytes needed.

The study of the relationship between zeta potential and size, in terms of the Twar Velegol potential indicated that all the samples prepared were within the stability range. Both systems (like templates), (1) liposome formed by DOPC and (2) DOPC/DODAB liposomes uncoated, it was studied some coated systems with different polyelectrolyte. The adsorption of latex particles onto the surface of the liposome formed structures like coloidosomes, with stability enhancement.

The second most important system that we studied was the pair of polyelectrolytes which depended on pH, poly(glutamic acid / poly-L-lisine), PGA / PLL. For DOPC liposomes were made two studies, in one of them the

first layer was poly(ethyleneimine), PEI, which enhances the adsorption of subsequent layers of PGA / PLL and the other one was with PGA/PLL system. Dispersion data showed the same layer grown in all three cases but the layer thickness values were different. We covered the DOPC:DODAB liposomes system with the anionic polyelectrolyte, PGA, coating which resulted in an average thickness of 12 nm and with the second layer, cationic polyelectrolyte, PLL, the thickness resulted of 4 nm. In the system formed by DOPC liposomes, the thickness for all the layers, either PEI or PLL PGA was approximately 10 nm.

The DOPC/DODAB liposomes system was characterized by other scattering techniques, in this case SANS and SAXS that from a point of view general, they gave complementary information provided by other dispersion techniques. With both techniques the liposome bilayer thickness was determined, which resulted values of 4 nm. For the determination of these data we applied the hollow sphere model and Guinier Law at low angles which resulted in an agreement between the results.

The study of these systems formed by DOPC:DODAB and DOPC was expanded using two surface techniques, (1) quartz balance (QCM) and (2) ellipsometry so that in this moment the study was on planar systems. The purpose of this study was to obtain more information on the adsorption of the liposomes on planar substrates, and determine the percentage of water trapped in the lipid bilayer. It was observed that the adsorption and the lipid bilayer formation on the substrate depended on substrate's nature. For the gold substrates, the bilayer formation was faster while for the silicon substrate was much slower. The polymer multilayer adsorption showed a more or less pronounced odd-even effect. This fact allowed us to determine the amount of water absorbed in both cases and corresponded to the 50-90% growth values studied for the case of the system formed by the polyelectrolytes PSS/PAH and of 30-50 % in the case of biopolymers PGA/PLL system. In the first case, the amount of water adsorbed decreased as the layers increased, which is attributable to layer's compaction, which is not true for the second system that maintains the same % during all adsorbed layers.

We developed the study of pH and temperature for a cationic microgel, pNIPAm-co-(1-vinyl-imidazole), p-(NIPAM)-co-VI. First, the microgel was made in the laboratory and we characterized it by DLS and by Zeta Potential technique. Onto microgel were adsorbed polyelectrolytes by the Layer-by-Layer technique. These polyelectrolytes were PGA/PLL and

PSS/PDADMAC. The relevant results showed with this new template confirmed the reliability in the Layer-by layer-technique used in all systems.

For this case, microgels, the light scattering techniques and zeta potential again confirmed the adsorption of the polyelectrolyte onto the cationic microgel and the effect observed was an odd-even pattern in total adsorbed layers. Stability studies showed that this system is very stable along time and thus it is a good candidate like a drug delivery system.

The further development of complex structures of which the liposomes were part, playing the role of nano-reactors, has expanded the possibilities in their applications. The formation of more complex structures started with: (1) liposomes coated with latex nanoparticles, (2) latex particles coated with liposomes, (3) liposomes coated with homopolymers, (4) hybrid formation in which the liposomes and (5) nanocapsules coated polymer layers. The hybrid system derivated from the capsosomes and was structured with a first layer of polymeric nanoparticles, intermediate polymer layers and finally adsorbed liposomes coated all of them with PMAS_{SH} /PVP bilayers to obtain a microcapsule with different internal nanocarriers. The tests developed to ascertain the functionalization of these systems were the encapsulation of an enzyme into the liposome and subsequent degradation of the nanocapsule. Through these experiments we observed that it possesses the potential for future applications.

7 SUMMARY

In the last few years, the development of nanoscience and nanotechnology has attracted great interest in different fields. Nanoscience is the science that studies the systems that have at least one of their dimensions of nanometer-size. The study, design, creation, synthesis, manipulation and application of materials, devices and functional systems through control of matter at the nanoscale is known as Nanotechnology. It is frequently considered that the birth of Nanoscience and Nanotechnology goes back to a sentence in a famous conference by Richard Feynman in 1959: There is plenty of room at the bottom. In this conference he suggested the possibility of manufacturing products based on the rearrangement of atoms and molecules. As soon as scientist has begun to manipulate matter at a small scale, new phenomena and properties were founded and nanotechnological methods are used to create inexpensive systems with unique properties. In this way, materials, devices and systems, whose new properties make them useful at physical, chemical and biological levels, are being studied and developed. In 1980 Eric Drexler proposed the concept of "molecular nanotechnology", which focuses on the construction of nanomachines made of atoms that are able to build other molecular components themselves.

With the aim of using nanomaterials as carriers of molecules, various types of nanomaterials have been developed such as nanoparticles or carbon nanotubes; and different types of biomaterials such as dendrimers, liposomes or biodegradable polymers. More recently the design of "nanocapsules" has been the object of intense activity. They are hollow nanoscale objects with a roughly spherical shape able to trap small quantities of drugs, enzymes and other catalysts in their interior. Two different regions can be distinguished: the cavity and the coating, which is frequently made of polyelectrolyte multilayers. The best known technique to obtain these systems is by the Layer-by-layer (LbL) or electrostatic self-assembly technique.

The LbL technique, which is based on the sequential adsorption of interacting polymers on a template, has been used in the preparation of functional and highly tailored thin films. This technique is simple, inexpensive and extremely versatile; thus a large number of materials and functional groups can be incorporated into the film structure. In 1998 the LbL technique was applied in the preparation of polymer capsules using colloidal templates. Since then, the interest in LbL-assembled capsules has grown, largely because of the ability to readily tailor their properties (e.g., size, composition, porosity, stability, surface functionality, colloidal

stability) for various biological applications, including sensing, diagnostics and drug delivery.

Obtaining nanocapsules by technical layer-by-layer has advantages over other known techniques, such as the technique of self-assembled monolayers (SAM) or Langmuir-Blodgett, since it is a more simpler and less expensive and allows the obtaining stable complex structures with nanoscale control of structure and composition.

LbL technique consists in adsorbing species with multiple charges, generally polyelectrolyte, on macroscopic charged surfaces, so that adsorption of each layer causes the inversion of surface charge, finally obtaining a multilayer complex. In this way the internal space formed provides the place in which various molecules may be encapsulated and protected from the environment in which they are found.

In general steps, for the production of nanocapsules, charged templates used, which may be organic or inorganic, and on its surface adsorbing layers are oppositely charged species, such as polyelectrolyte, and finally the template is being eliminated.

The polyelectrolytes are polymers formed by groups of hydrocarbon monomers, resulting in a hydrophobic chain to which they ionic groups with highly charged are attached. The vast majority have been assembled by the alternate deposition of synthetic polycations and polyanions, including poly(ethyleneimine) (PEI), poly(allylamine hydrochloride) (PAH), poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDADMAC), poly(sodium-4-styrenesulfonate) (PSS) and poly(acrylic acid) (PAA). Electrostatic binding remains the main driving force used in multilayer formation, but capsules can also be prepared from films held together by disulfide linkages, click chemistry, and hybridization of complementary DNA strands. In addition, as the interest in the use of the capsules as delivery vehicles grows, capsules composed of polypeptides such as poly(L-Lysine), poly(L-glutamic acid), poly(L-arginine) and poly(L-histidine) and carbohydrates, including chitosan, dextran and their derivatives, have been used.

Depending on the type of template used, the charging process of the molecule that is to encapsulate varies and could be performed in the final step with the dissolution of the template by a pH change, the polarity of the solvent, ionic strength or temperature change, which implies a change in permeability of the multilayer. In some cases the molecules to be

encapsulated mixed with the colloid particle precursors at the time of its synthesis. Furthermore, the layers of the nanocapsule obtained can be modified by the addition of metal, fluorescent or magnetic nanoparticles, thereby important functions are introduced in the nanocapsule, including the method of triggering the release of its content.

One of the materials used as carriers of different molecules, and as templates for building nanocápsulas, are liposomes. Liposomes were discovered in 1965 by Alec D. Bangham and coworkers, who showed that certain lipids may form artificial membrane structures when they are in the presence of excess water. These vesicular highly organized structures are constituted by a wall formed by lipid bilayers (lamella) and an aqueous core. Usually phospholipids are used for their preparation.

Liposomes can be obtained from different methods. Depending on the method used, the liposomes obtained present different characteristics such as size, polydispersity, lamellarity, etc. To prepare the liposomes, the first step is to dissolve the lipids in an organic solvent, usually chloroform, so as to obtain a solution of the desired lipid. An aliquot of this solution was taken, usually not exceeding 1 mL, and the solvent was evaporated using a nitrogen stream. Afterwards the lipid film was hydrated by adding water and stirring above the *phase transition temperature* of the lipid used. For this hydration we have used a buffer or saline solution that spontaneously had to relatively large and heterogeneous multilamellar vesicles (MLV). Using this suspension of multilamellar vesicles and applying ultrasound, small unilamellar liposomes were obtained.

Later on the suspension of multilamellar vesicles was extruded by passing it through a polycarbonate membrane filter with a pore size well defined. In this way, the diameter and homogeneity of the liposomes obtained was controlled in a precise way.

In this work we have shown, by carrying out different studies, which liposomes containing on its surface polymer chains can be obtained by hydration-extrusion method. For its characterization, we performed measurements of dynamic light scattering; this technique has given us the information required for the liposomes

8 BIBLIOGRAFÍA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ellipsometry>.
2. <http://preujct.cl/biologia/curtis/libro/c4e.htm>.
3. Nelson D, C.M., *Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition*. 5th ed. 2008, Hardcover: W. H. Freeman. 1100.
4. Hernandez, L.G., C., *Introducción al análisis instrumental*. Lucas Hernández Hernández. 2002.
5. Ubero, Pascual, N. http://ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/material_clase/presentacion_2.pdf. 2011.
6. Stalgre, J., *Adsorption of Surfactants at the Solid-Liquid Interface: A Quartz Crystal Microbalance study*, in *Department of Chemistry, Surface Chemistry*. 2002, Royal Institute of Technology: Stockholm, Sweden.
7. Forster, S., *Polyelectrolyte in Solution*. *Advances in polymer Science*, 1995. **120**: p. 82.
8. Minsky, M. <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>.
9. Jones, M., *The surface Properties of Phospholipid Liposome Systems and their Characterization*. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 1995. **54**: p. 31.
10. Rigler, R.M., U., *Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam*. *Laser Spectroscopy of Biomolecules*, 1992. **1921**(239).
11. Chandrawati, R.S., B.; Postma, A.; Zelikin, A., *Cholesterol-mediated anchoring of enzyme-loaded liposomes within disulfide-stabilized polymer carrier capsules*. *biomaterials*, 2009. **30**: p. 10.
12. Afroze, F.N., E.; Berghmans, H., *Phase Transitions in the System poly(N-isopropylacrylamide)/water and swelling behaviour of the corresponding networks*. *Journal of Molecular Structure*, 2000. **554**(1): p. 13.
13. Zelikin, A.Q., J.; Caruso, F., *Disulfide Cross-Linked Polymer Capsules: En Route to Biodeconstructible Systems*. *Biomacromolecules*, 2006. **7**: p. 3.
14. Skoza, F.P., D., *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)*. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1980. **9**: p. 41.
15. Städler, B.P., A. D.; Chandrawati, R.; Hosta-Rigau, L.; Zelikin, A. N.; Caruso, F., *Polymer Hydrogel Capsules: en route toward Synthetic Cellular Systems*. *Nanoscale*, 2009. **1**: p. 5.
16. Meng, Z., *Self-assembly and chemo-ligation strategies for polymeric multi-responsive microgels*.
, in *School of Chemistry and Biochemistry* 2009, Georgia Institute of Technology: Georgia. p. 249.
17. Städler, B., Chandrawati, R. Price, A., *A Microreactor with Thousands of Subcompartment: Enzyme-loaded Liposomes within Polymer Capsules*. *Angew. Chem. Int.*, 2009. **48**: p. 3.

18. www.gatan.com.
19. Delgado, A.V., *Interfacial Electrokinetics and Electrophoresis*. Vol. 106. 2002, New York: Marcel Dekker.
20. Cherdhirankorn, T.B., A.; Koynov, G.; Peneva, K.; Muellen, K.; Fytas, G., *Diffusion in Polymer Solutions Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B., 2009. **113**: p. 4.
21. Chaparro, L., *Novel Polymer-Metal Nanocomposites for Applications in Detection and Sensing*, in *Department of Chemical Engineering*. 2007, Universidad del sur de Florida: Florida. p. 65.
22. Keller, S.W., H.-N. Kim, and T.E. Mallouk, *Layer-by-Layer Assembly of Intercalation Compounds and Heterostructures on Surfaces: Toward Molecular "Beaker" Epitaxy*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(19): p. 8817-8818.
23. <http://www.texample.net/tikz/examples/focused-ion-beam-system/>.
24. <http://faculty.virginia.edu/teamhull/project%20introductions/kubis-revised1.htm>.
25. Evans, E., Kwok, R., *Biochemistry*. Vol. 21. 1982, New York.
26. Gennis, R.B., *In Biomembranes-Molecular Structure and Function*. Vol. 1. 1989, New York: Springer Advances Texts in Chemistry. 553.
27. Dobereiner, H.E., E. Kraus, M. Seifert, U. and Wortis, M., *Mapping Vesicle Shapes into the phase Diagram: A comparison of Experiment and Theory*. Physical Review E., 1997. **55**: p. 16.
28. Dobereiner, H.S., O. and Lipowski, R., *Spontaneous Curvature Induced by Trans-membrane Sugar Asymmetry*. European Biophysical Journal, 1999. **28**: p. 4.
29. Gero Decher (Editor), J.B.S.E., *Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.
30. Sukhorukov, D., Mohwald, *Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, , 1999. **137**(1): p. 14.
31. Decher, G.S., Joseph B., *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*. 2003, Weinheim: Wiley-VCH. 543.
32. Cebada, T.T., *Nanoquímica y nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares* Encuentros multidisciplinares, 2002. **4**(12): p. 21.
33. Franks, A., *Nanotechnology*. J Journal of Physics E: Scientific Instruments, 1987. **20**: p. 1442-1451.
34. Castellanos-Román, M., *Nanotecnología: La última revolución industrial*. Educación Química, 2003. **14**(4).
35. Drexler, K.E., *Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation*. 1992, New York: John Wiley.
36. Serena, P., *Nanociencia y nanotecnología: aspectos generales*. Encuentros multidisciplinares, 2002. **4**(12).

37. Lasic, D., *Novel applications of liposomes*. Trends. Biotechnology, 1998. **16**: p. 14.
38. Lasic, D., *Liposomes from Physics to Applications*. 1993, Elsevier: Amsterdam.
39. Gerasimov O.V., B.J.A., Qualls M.M., Thomson D.H., *Cytosolic drug delivery using pH- and light-sensitive liposomes*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1999. **38**: p. 1.
40. Yatvin M.B., K.W., Horwitz B.A., Shinitzky M., *pH-sensitive Liposomes: possible clinical implications*. Science, 1980. **210**: p. 2.
41. Karl Kratz, T.H., Wolfgang Eimer, *Structural changes in PNIPAM microgel particles as seen by SANS, DLS, and EM techniques*. Polymer, 2001. **42**: p. 6631-6639.
42. G. Decher, J.-D.H., *Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: I. consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles*. Makromol. Chem., Macromol. Symp., **1991**. **46**: p. 321-327
43. Allen, T.M.C., P.R., *Drug delivery Systems: Entering the mainstream*. Science, 2004. **303**(5665): p. 4.
44. Bae, Y.F., S.; Harada,A;Kataoka,K., *Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH range*. Angew. Chem. Int, 2003. **42**(38): p. 3.
45. Qiu, Y.P., K., *Environment-sensitive Hydrogels for Drug Delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **53**(3): p. 18.
46. Zhu, Y.S., J.L.;Shen,W.H.;Dong,X.P.;Feng,J.W.;Ruan,M.L.Li,Y., *Stimuli-responsive controlled drug release from a hollow mesoporous silica sphere/polyelectrolyte multilayer core-shell structure*. Angew. Chem. Int, 2005. **44**(32): p. 4.
47. Zhou, W.X., A.;Wang,J.;Shen,W.;Chen,Z.;Wang,X., *Characteristics, phase behavior and control release for copolymer-liposome with both pH and temperature sensitivities*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,, 2011. **395**: p. 7.
48. Small, D., *The Physical Chemistry of Lipids: From Alkanes to Phospholipids. Handbook of Lipid Research*. Vol. 4. 1986, New York: Plenum Press.
49. Gennis, R.B., *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. 1989, New York: Springer-Verlag.
50. Rosen, B.P.K., E.R., *Bacterial Transport*, ed. B.P.E. Rosen. 1978, New York: Marcel Dekker. 61.
51. P Méléard, C.G., T Pott, L Fernandez-Puente, I Bivas, M D Mitov, J Dufourcq, and P Bothorel, *Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content*. Biophys J., **1997**. **72**(6): p. 13.

52. Rawicz, W., Olbrich, K., McIntosh, T., *Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers*. Biophysical Journal, 2000. **79**: p. 11.
53. Tanford, C., *The Hydrophobic Effect*. 1980, New York: Wiley.
54. Israelachvili, J., *Intermolecular and Surface Forces*. 1992, New York: Academic Press.
55. Kinnunen, P., Rytömaa, M., Lehtonen, J., *Chemistry Physics Lipids*. Lipids, 1993. **66**: p. 10.
56. Goni, F.A., A., *Spectroscopic Techniques in the Study of Membrane Solubilization, REconstitution and Permeabilization by Detergents*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **508**: p. 7.
57. Meyer, H.R., A., *Freeze-Fracture Studies on Lipids and Membranes*. Micron., 2001. **32**: p. 29.
58. Grit, M.d.S., J.H.; Struijke, A.; Crommelin, D.J.A., *Hydrolysis of Phospholipids in Aqueous Liposome Dispersions* Vol. 1 1989. 50.
59. Grit, M.Z., N.J.; Crommelin, D.J.A., *Analysis and Hydrolysis Kinetics of Phospholipids in Aqueous Liposome Dispersions, in Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques*. 2nd ed. Vol. 1. 1993.
60. Mouritsen, O.G., *In Life-as a matter of fat-The Emerging Science of Lipidomics*. Vol. 1. 2005, Germany: The Frontiers. Collection Springer.
61. Abramson, M., *Structural Changes in Lecithin-Water Systems: Thermal Turbidimetric Studies*. Biochimica et Biophysica Acta, 1971. **225**: p. 3.
62. Overath, P., *Phase Transitions in Cells. Membranes and Lipids of Sterichia Choli. Detection of Fluorescent Probes. Light Scattering and Dilatometry*. Biochemistry, 1973. **12**: p. 9.
63. Yi, P.a.M., R., *Temperature Dependence of Optical Properties of Aqueous Dispersions of Phosphatidylcholine*. Chemistry and Physic of Lipids, 1973. **11**: p. 20.
64. Méléard P, G.C., Bardusco P, Jeandaine N, Mitov MD, Fernandez-Puente L., *Mechanical properties of model membranes studied from shape transformations of giant vesicles*. Biochimie, 1998. **80**(5-6): p. 13.
65. Meyer, H.W., M. Richter, A., *Minimal Radius of Curvature of Lipid Bilayers in the Gel Phase correspond to the Dimension of Biomembrane Structures*. Journal Struct. Biol., 1998. **124**: p. 10.
66. Ulrich, S., *Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles*. Bioscience Reports, 2002. **22**: p. 21.
67. Simon, S.A.M., T.J., *Depth of Water Penetration into Lipid Bilayers*. Meth. Enzymol., 1986. **127**: p. 511.
68. Crowe, J.H.a.L.M., *Factoring affecting the stability of dry Liposomes*. Biochimica et Biophysica Acta, 1988. **939**: p. 327.

69. Bangham, A., *A Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of Phospholipids*. Nature, 1961. **23**: p. 1.
70. Bangham, A., *Membrane Models with Phospholipids*. Prog Biophys Mol Biol, 1968. **18**: p. 66.
71. Duwe, H., Sackmann, *Bending Elastic Moduli of Lipid Bilayers*. Journal of Physics, 1990. **51**: p. 17.
72. Vemuri, S.a.R., C., *Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: a Review*. Pharmaceutic Acta Helv, 1995. **70**: p. 16.
73. Gregoriadis, G., *Liposome: Preparation and Related Techniques*. Vol. 1. 1992, Florida: CRC Press.
74. Gregoriadis, G., *Engineering Liposomes for Drug Delivery. Progress and Problems*. Trends Biotechnology, 1995. **13**: p. 10.
75. Lian, T., *Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems*. Pharmaceutic Science, 2001. **90**(6): p. 13.
76. Langmuir, I., Journal American Society of Chemistry, 1917. **39**: p. 18.
77. Kinnunen, P., *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*. Vol. 1. 1996. 18.
78. Israelachvili, J., Marcelja, S. Horn, R., *Physical principles of membrane organization. Quarterly Reviews of Biophysics, in Biophysical Review*. 1980, Cambridge University Press Canberra (Australia). p. 9.
79. Chung, H., Kim, T., Kwon, M, *Oil Components Modulate Physical Characteristics and Function of the Natural Oil Emulsions as Drug or gene Delivery Systems*. J. Control Release, 2001. **71**: p. 11.
80. Zhai, L.M.Z., J.; Shi, Q.; Chen, W.; Zhao, M., J. Colloid Interface Sci., 2005. **284**.
81. Aniansson, E.W., S.; Almgren, M.; Hoffman, H.; Kielmann, I.; Ulbricht, W.; Zana, R.; Lang, J.; Tondre, C. , *Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants*. J. Phys. Chem., 1976. **80**.
82. Dan, N.S., S.A., *Self-Assembly in Mixtures of Diblock Copolymers*. Macromolecules, 1994. **27**(20): p. 6.
83. Safran, S.A., *Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces and Membranes*. 1994, New York: Addison-Wesley. 5.
84. Helfrich, W., *Elastic Properties of Lipid Bilayers. Theory and Possible Experiments*. Z. Naturforsch, 1973. **28**: p. 10.
85. Derjaguin, B.L., L., *Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*. Acta Physico Chemica URSS, 1941. **14**: p. 29.
86. Verwey, E.J.W.O., J. Th. G. , *Theory of the stability of lyophobic colloids*. 1948, Amsterdam: Elsevier. 218.

87. Bordi, F.C., C.; Sennato, S.; D. Viscomi, D., *Polyion-induced liposomal vesicle aggregation: a radiowave dielectric relaxation study*. J.Chem.Phys., 2007. **126**: p. 024902.
88. Bordi, F.C., C.; Diociaiuti, M.; Sennato, S., *Large equilibrium clusters in low density aqueous suspensions of polyelectrolyte-liposome complexes: A phenomenological model*. Phys. Rev. E., 2005. **7**: p. 050401.
89. Nguyen, T.T.S., B., *Complexation of a polyelectrolyte with oppositely charged spherical macroions: Giant inversion of charge*. J.Chem.Phys., 2001. **114**.
90. Nguyen, T.T.S., B., *Macroions in Salty Water with Multivalent Ions: Giant inversion of Charge*. Phys. Rev. Lett., 2000. **85**: p. 3.
91. Bordi, F.C., C.; Sennato, S.; D. Viscomi, D., *Counterion release in overcharging of polyion-liposome complexes*. Phys. Rev. E., 2006. **74**: p. 030402.
92. Sennato, S., Bordi, F.; Cametti, C.; Marianecchi, C., Carafa, M., Cametti, M., *Hybrid Niosome Complexation in the Presence of Oppositely Charged Polyions*. J. Phys. Chem. B., 2008. **112**: p. 7.
93. Truzzolillo, D.B.C., C.; Sennato, S., *Phenomenological surface characterization of cationic-lipid monolayers in the presence of oppositely charged polyions*. Colloids Surf A., 2008. **319**: p. 10.
94. Zuzzi, S.C.O., G., *Polyion-Induced Aggregation of Lipidic-Coated Solid Polystyrene Spheres: The Many Facets of Complex Formation in Low-Density Colloidal Suspensions*. Langmuir, 2008. **24**(12): p. 5.
95. Velegol, D.a.T., P.K., *Analytical model for the effect of surface charge nonuniformity on colloidal interactions*. Langmuir, 2001. **17**(24): p. 6.
96. Hogg, R.H., T.W.; Fuerstenau, D.W., *Mutual coagulation of colloidal dispersions*. Trans. Faraday Soc., 1966. **62**: p. 13.
97. Nayar, R.M., Hope, J., Cullis, P., *Generation of Large Unilamellar Vesicles from Long-Chain Saturated Phosphatidylcholines by Extrusion Technique*. Biochimica et Biophysica Acta, 1989. **986**: p. 6.
98. Jones, M.C., D., *Micelles, Monolayers and Biomembranes*. 1995, New York.
99. Rosoff, M., *Vesicles*. 1996, New York.
100. Talmon, Y.B., M., Chestnut, M. and Siegel, D., *Time-Resolved Cryotransmission Electron Microscopy*. Journal of Electron Microscopy Technique, 1990. **14**: p. 6.
101. Hallet, F.W., J, and Krygsmann, P., *Vesicle Sizing: Number Distributions by Dynamic Light Scattering*. Biophysical Journal, 1991. **59**: p. 15.
102. New, R., *Liposomes. A Practical Approach*. Vol. 58. 1994, Oxford University Press: IRL Press
103. Israelachvili, J., *Role of Hydrophobic Forces in Bilayer Adhesion and Fusion*. Biochemistry, 1992. **31**(6): p. 11.

104. Kirby, C.G., G., *Dehydratation -Rehydration vesicles:a Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes*. Biotechnology, 1984. **2**: p. 5.
105. Lanio, M.L., M.;Alvarez,C., *Humoral Immune Response against Epidermal Growth Factor Encapsulated in Dehydration Rehydration Vesicles of Different Phospholipid Composition*. J. Liposome Res., 2008. **18**: p. 19.
106. Rickwood, D.H., B., *Liposomes: a Practical Approach*. New RRC. 1989, Liverpool, UK: Oxford University Press.
107. Frezard, F., *Liposomes: from Biophysics to the Design of Peptide Vaccines*. Braz J. Med. Biol. Res., 1999. **32**: p. 8.
108. Kremer, H.V.d.E., M., *Vesicles of Variable Diameter Prepared by a modified Injection Method*. Biochemistry, 1977. **16**: p. 3.
109. Ollivon, M.L., S., *Vesicle Reconstitution from Lipid-detergent Mixed Micelles*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. **1508**: p. 16.
110. Szoka, F.a.P., D, *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)*. Ann. Rev. Biophs. Bioeng., 1980. **9**: p. 41.
111. Saunders, B.P., J., *Ultrasonic Irradiation of Some Phospholipid Solutions*. J.Pharm. Pharmacol., 1962. **14**: p. 4.
112. Talsma, H.O., A.;Van Bloois,L., *The Size Reduction of Liposome with a High Pressure Homogenizer (Microfluidizer): Characterization of Prepared Dispersions and Comparison with Conventional Methods*. Drug Dev. Ind.Pharm., 1989. **15**: p. 10.
113. O.Callaghan, C.H., A. Morris, S.M. Kirby, and S.H. Shingler, *Novel method for detection of β -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate*. . Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1972. **1**: p. 5.
114. Winden, E.Z., N.;Crommelin,D., *Strategies for Large Scale Production and Optimized Stability of Pharmaceutical Liposomes Developed for Parenteral Use*. Medical Applications of Liosomes. 1998: Eslsevier Science.
115. Hafez, M.C., P., *Roles of Lipid Polymeorphism in Intracellular Delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **47**: p. 9.
116. Lasic, D., *Liposomes in Gene Delivery*, in CRC Press, B. Ratón, Editor. 1997.
117. Smyth, N.L., D., *New Directions in Liposome Gene Delivery*. Mol. Biotechnol., 1999. **11**: p. 5.
118. Mouritsen, O.G.J., K., *A New Look at Lipid Membrane Structure in Relation to Drug Research*. Pharm. Res., 1998. **15**: p. 12.
119. Gallardo, A.V., B.;San Roman,J., *Sistemas de Liberación Controlada de Medicamentos*. Biomaterials. 2004. 19.
120. Clares, B., *Sistemas de Transporte y Liberaci'ón de Fármacos de Aplicación Tópica:Liposomas Multilamelares Portadores d Triamcinolona*. 2003, Universidad de Granada: Granada.

121. Storm, G.C., D.;Beckerleg,K., *Liposomes: quo vadis?* Pharm.Sci.Technol. Today, 1998. **1**: p. 12.
122. Klivanov.A.Maruyama, K.B., .A.;Torchilin,V., *Amphipatic Polyethylenglycols Effectively prolong Circulation Time in Liposomes.* FEBS Lett., 1990. **268**: p. 2.
123. Senior, J.D., C.;Fischer,D., *Influence of Surace Hydrphylicity of Liposomes on their Interaction with Plasma Proteins and Clearance from the Circulation; Studies with Polyethylenglycol-coated Vesicles.* Biochim. Biophys. Acta, 1991. **1062**: p. 5.
124. Inmordino, M.D., F.;Cattel,L., *Stealth Liposomes: Review of the Basic, rationale and Clinical Applications;Existing and Potential.* Int.J.Nanomed., 2006. **1**: p. 18.
125. Torchilin, V.T., V.;Whitemen,K., *New Synthetic Amphiphilic Polymers for the Steric Protection of Liposomes in Vivo.* J.Pharm.Sci., 1995. **84**: p. 4.
126. Torchilin, V., *Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting.* Annu.Rev.Biomed.Eng., 2006. **8**: p. 22.
127. Schnyder, A.K., S.;Torok,S., *Targeting of Skeletal Muscle in Vitro using Biotinylated Immunoliposomes.* Biochim. J., 2004. **377**: p. 6.
128. Frkjaer, S.H., E.L., *Stability and Storage of lLiposomes, in Optimization of Drgug Delivery.* 1982, Copenhagen: Bundgaard, H.; Bagger A.; Kofod, H.
129. Cevc, G.M., D. , *Phospholipid Bilayers.* 1984, New York: Wiley-Interscience Publications.
130. Langner, M.K., K., *Chem. Phys. Lipids.* Lipids, 1999. **101**: p. 32.
131. Molina-Bolivar, J.A.G.-G., F. Hidalgo-Alvarez, R., *The role played by hydration forces in the stability of protein-coated particles: Nonclassical DLVO behavior.* Colloids and Surfaces A: Biointerfaces, 1999. **14**: p. 4.
132. Saunders, B.V., B., *Microgel Particles as Model Colloids: Theory, Properties and Applications.* Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **80**(1): p. 25.
133. López García, O.C., A.;Ruiz,R., *Materiales Inteligentes I y II. Introducción a los materiales del siglo XXI.* Anales de mecánica y eletricidad, 2003. **40**.
134. *Smart Materials know when to change Properties.* Metal Progress, 1988. **134**(3).
135. Hoffman, A., *Environmentally Sensitive Polymers and Hydrogels:Smart Biomaterials.* MRS bull, 1991. **16**(9): p. 5.
136. Hirokawa, Y.T., T.;Sato,E., *Phase Transition of Positively Ionized Gels.* Macromolecules, 1984. **18**(12): p. 2.
137. Xin, L.Z., J.;Yong,L., *Soap-free Seeded Dispersion Polymerization Toward Monodisperse pH- and Temperature-Responsive Microgels.* Chemical Technology, 2009. **30**(7): p. 4.

138. Senff, H.R., W., *Temperature sensitive Microgel Suspensions: Colloidal Phase behavior and Rheology of Soft Spheres*. Journal of Chemical Physics, 1999. **111**(4): p. 7.
139. Byeongmoon, J.G., *Correction: Lessons from Nature, Stimuli-responsive Polymers and their Biomedical Applications*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(7): p. 6.
140. Ogaka, Y.O., K.; Benlian W.; Kokufuta, E., *A Biochemo-Mechanical System Consisting of Polyampholyte Gels with Coimmobilized Glucose Oxidase and Urease*. Langmuir, 2001. **17**: p. 4.
141. Wu, C.W.X., *Globule-to-Coil Transition of a Single Homopolymer Chain Solution*. Physical Review Letters, 1998. **80**(18): p. 2.
142. Lyon, A.M., Z.; Sorrell, D., *Thermoresponsive microgel base materials*. Chem Soc., 2009. **38**: p. 9.
143. Huang, J.W., X., *Effects of pH, Salt, Surfactant and Composition on Phase Transition of poly(NIPAM/MAA) Nanoparticles*. Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry, 2000. **37**(14): p. 9.
144. Hruby, M.K., J.; Lebeda, O., 2007. J Controlled Release. **119**(1): p. 8.
145. Schmaljohann D., *Thermo- and pH- Responsive Polymers for Possible Radiotherapeutic Applications*. J. Control Release, 2006. **119**(1): p. 8.
146. Doi, M., *Introduction to Polymer Physics*, ed. O. Univ. 1996, New York: Press Inc.
147. Zhang, Y.T., T.; Shibayama, M., *Super-absorbency and Phase Transition of Gels in Physiological Salt Solutions*. Nature, 1992. **360**(6400): p. 2.
148. Flory, P.J., *Principles of polymer chemistry*, ed. C.U. Press. 1986, London.
149. De Gennes, P., *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, 1979.
150. Fernandez-Barbero, A.F.-N., I.; López-Cabarcos, E., *Structural Modifications in the Swelling of Inhomogeneous Microgels by Light and Neutron Scattering*. Phys. Rev. B., 2002. **66**: p. 5.
151. Flory, P.J.R., J., *Statistical Theory of Chain Configuration and Physical Properties of High Polymers*. J.Chem.Phys., 1943. **44**: p. 10.
152. Sperling, L.H. *Introduction to Physical Polymer Science*. 1992; Second:[
153. Boutris, C.C., G.; Kiparissides, C., *Characterization of the LCST behavior of Aqueous poly(N-isopropylacrylamide) solutions by Thermal and Cloud Point Techniques*. Polymer, 1997. **38**(10): p. 3.
154. Aguilar, M.E., C.; Gallardo, A.; Román, J.S., *Smart Polymers and their Applications as Biomaterials*, ed. T.i.T. Engineering. Vol. 1. 2007.
155. Hoffman, N.K.M.T.A., *Swelling Behavior of Hydrogels containing Phosphate Groups*. Makromol. Chem., Macromol. Chemistry and Physics, 1992. **193**(4): p. 7.

156. Miyata, T.O., K.; Hoffman, A.S.; Kanzaki, I., *Stimuli-sensitivities of Hydrogels containing Phosphate Groups*. Makromol. Chem., Macromol. Chemistry and Physics, 1994. **195**(4): p. 9.
157. Hoffman, A., *Intelligent Polymers*. Controlled Drug Delivery: Challenge and Strategies ed. Vol. 485. 1997, Washington D.C.: American Chemical Society.
158. Bae, Y., *Stimuli Sensitive Drug Delivery*. Controlled Drug Delivery: Challenge and Strategies ed. Vol. 147. 1997, Washington D.C.: American Chemical Society.
159. Grekeler, M.Y.P.T., *Stimuli-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate) Hydrogels*. Reactive and Functional Polymers, 2007. **67**: p. 14.
160. Barrat, J.L.J., J.F., *Theory of Polyelectrolytes Solutions*. Advances in Chemical Physics, 1996. **94**: p. 66.
161. Baeurle, S.N., E., *Challengin Laws of Flexible Polyelectrolyte Solutions with Effective Renormalization Concepts*. Polymer, 2007. **48**: p. 16.
162. Ulrich, S.S.M.S.S., *The many facets of polyelectrolytes and oppositely charged macroions complex formation*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 2006. **11**: p. 3.
163. Winkler R.G., G.M.a.R.P., Physical Review Letters, 1998. **80**: p. 3.
164. Lyklema, J., *Fundamentals of Interface and Colloid Science*. Vol. 2. 1995, London: Academic Press.
165. S., M.G., *Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions I. Colligative Properties*. Journal of Chemical Physics, 1969. **51**(3): p. 10.
166. Oosawa, F., *Deformation of networks by detachment and formation of crosslinks*. Journal of Polymer Science 1958. **32**: p. 17.
167. Nobuhisa, I.T., O., *Analytical solution of Poisson-Boltzmann equation for two-dimensional many-center problem*. Journal of Chemical Physics, 1959. **30**: p. 1.
168. Onsanger, L.P., O., *Bose-Einstein condensation and liquid helium*. physical Review Letters, 1956. **104**: p. 18.
169. Bjerrum, N., K. danske Vidensk. Selsk. , 1926. **7**(9): p. 1.
170. Castelnovo, M.J., J., *Complexation between Oppositely charged Polyelectrolytes: beyond the Random Phase Approximation*. The European Physical Journal, 2001. **6**(5): p. 9.
171. Voigt, U.K., V.Tauer, K., *The effect of Polymer Charge Density and Charge Distribution on the Formation of Multilayers*. J.Phys.:Condsens. Matter, 2003. **15**: p. 5.
172. Caruso, F.N., K.; Furlong, D., *Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Golds. Construction and Thickness Determination*. Langmuir, 1997. **13**.
173. Lavalle, P.; Picart, C.M., J., J.Phys.Chem., 2004. **108**.

174. Ruths, J.E., F.; Decher, G.; Riegler, H., *Polyelectrolytes I: Polyanion/Polycation Multilayers at an Air/Monolayer/Water/Interface as Elements for Quantitative Polymer Adsorption Studies and Preparation of Hetero-superlattices on Solid Surfaces*. Langmuir, 2000. **16**.
175. Schlenoff, J.D., S., *Mechanism of Polyelectrolyte Multilayer Growth: Charge Overcompensation and Distribution*. Macromolecules, 2001. **34**: p. 6.
176. Sens, P.M., C.; Joanny, J., *Viscoelasticity of Adsorbed Polymer Layers*. Macromolecules, 1993. **27**: p. 8.
177. Bertrand, P.J., A.; Laschewsky, A., *Ultrathin Polymer Coatings by Complexation of Polyelectrolytes at Interfaces: Suitable Materials, structure and Properties*. Macromolecular Rapid Commun., 2000. **21**: p. 29.
178. Plench, A.S., T.; Münster, C.; Peisl, J., *Investigation of Structure and Growth of Polyelectrolyte Multilayers*. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. **223**(8): p. 74.
179. Dubas, S.S., J., *Factors controlling the Growth and Structure Formation*. Macromolecules, 1999. **32**: p. 7.
180. Arys, X.L., A.; Jonas, A., *Ordered Polyelectrolyte Multilayers. Mechanism of Growth and Structure Formation. A Comparison with Classical Fuzzy Multilayers*. Macromolecules, 2001. **34**: p. 12.
181. Delamarche, E.M., B.; Gerber, C., *Thermal Stability of Self-Assembled Monolayers*. Langmuir, 1994. **10**: p. 4103.
182. Blodgett, K., Journal. Am. Chem. Soc, 1935. **57**: p. 15.
183. McGuigan, P.Z., J.; Yin, F., *Scaling Issues in the Measurement of Monolayer Films*. Micro-nanotribology ed. Kluwer Academic Press, ed. N.A. series. 2001.
184. Ulman, A., *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*. Chem. Rev., 1996. **96**.
185. Ulman, A., *An Introduction to Ultrathin Films, from Langmuir-Blodgett to self-Assembly*. 1991, New York.
186. Iler, R.K., Colloids Interface Sci., 1966. **21**.
187. Decher, G.H., J.D.; Schmitt, J., *Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a self-Assembly Process: III. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces*. Vol. III. 1992. 4.
188. Hoogeveen, N.S., M.; Fleer, G., *Formation and Stability of Multilayers of Polyelectrolytes*. Langmuir, 1996. **12**: p. 6.
189. Decher, G.L., Y.; Schmitt, J., *Proof of Multilayer Structural Organization in self- Assembled Polycation-Polyanion Molecular Films*. Thin Solid Films. 1994. 5.

190. Caruso, F.C., RA.; Moehwald, H., *Nanoengineering of Inorganic and Hybrid Hollow Spheres by Colloidal Templating Science*. Science, 1998. **282**: p. 3.
191. Larsson, A.K., D. Schönhoff, M., *NMR of Thermoreversible Polymers in Solution and at Interfaces. the influence of charged Groups on the Phase Transition*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **190**: p. 7.
192. Ladam, G.S., P.; Voegel, J., *In Situ Determination of the Structural Properties of Initially Deposited Polyelectrolyte Multilayers*. Langmuir, 1999. **16**: p. 6.
193. Peyratout, C.D., L., *Taylor-made Polyelectrolytes: from Multilayers to Smart Containers*. Angew. Chem. Int, 2004. **43**: p. 21.
194. Schneider, G.D., G.; *Functional Core/Shell Nanoparticles via Layer-by-Layer Assembly. investigation of the Experimental Parameters for controlling Particle Aggregation and for Enhancing Dispersion Estability*. Langmuir, 2008. **24**: p. 11.
195. Malikova, N.P.-S., L.; Schierhorn, M.; Liz Marzan, L., *Layer by Layer Assembled mixed Spherical and Planar Gold Nanoparticles: Control of Interparticle Interactions*. Langmuir, 2002. **18**: p. 3.
196. Kolasinska, M.K., R.; Gutberlet, T., *Layer by Layer Deposition of Polyelectrolytes. dipping versus Spraying*. Langmuir, 2009. **25**(2): p. 8.
197. Russel, W.S., D.; Schowalter, W., *Colloidal Dispersions*. 1989: Cambridge University Press.
198. Dukhin, A.S., V., *Dynamic Electrophoretic Mobility in Concentrated Dispersed Systems. Cell -model*. Langmuir, 1999. **15**(10): p. 5.
199. Zukoski, C.S., D., *Electrokinetic Properties of Particles in Concentrated Suspensions*. Journal of Colloid and Interface Science, 1987. **115**: p. 14.
200. O'Brien, R., *Electroosmosis in Porous Materials*. Journal of Colloid and Interface Science, 1986. **110**(2): p. 10.
201. Levine, S.N., G., *The prediction of Electrokinetic Phenomena within Multiparticle Systems. Electrophoresis and Electroosmosis*. Journal of Colloid and Interface Science, 1974. **47**: p. 12.
202. Castelnovo, M.J., J., *Formation of Polyelectrolytes Multilayers*. Langmuir, 2000. **16**: p. 6.
203. Jomaa, H.S., J., *Salt Induced Polyelectrolyte Interdiffusion in Multilayered Films. A Neutron SReflectivity Study*. Macromolecules, 2005. **38**: p. 7.
204. Schönhoff, M., *Novel Methods to Study Interfacial Layers*. 2001, Amsterdam: Elsevier.
205. Hong, H.D., D., *Electroluminescence, Photoluminescence and X-Ray Reflectivity Studies of Self-Assembled Ultra-Thin Films*. Advanced Materials, 1995. **7**: p. 3.
206. Leguen, E.C., A.; Decher, G.; Shaaf, P.; Voegel, J.; and Jessel, N., *Bioactive Coatings Base on Polyelectrolyte Multilayer Architectures*

- Functionalized by Embedded Proteins, Peptides or Drugs*. Biomolecular engineering, 2007. **24**: p. 8.
207. Hoyle, C.Y., T.; Roper, T., *Thiol-Enes: Chemistry of the Past with Promise for the Future*. Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry, 2004. **42**: p. 37.
 208. Zelikin, A.N., A.D. Price, and B. Stadler, *Poly(Methacrylic Acid) Polymer Hydrogel Capsules: Drug Carriers, Sub-compartmentalized Microreactors, Artificial Organelles*. Small. **6**(20): p. 2201-2207.
 209. Zelikin, A.Q., L.; Caruso, F., *Degradable Polyelectrolyte Capsules Filled with Oligonucleotide Sequences*. Angew. Chem. Int, 2006. **45**: p. 2.
 210. Pohorille, A.D., D., Trends Biotechnology, 2002. **20**.
 211. Deamer, D., Trends Biotechnology, 2005. **23**.
 212. Garcia M. Bonay, P.A., J., Cancer letter, 1996. **99**: p. 7.
 213. Zhang, Y.R., W. Leduc, P., Trends Biotechnology, 1998. **26**: p. 6.
 214. Hosta-Rigau, L.S., B.; Yan, Y.; Nice, E. C.; Heath, J. K.; Albericio, F.; Caruso, F., *Capsosomes with Multilayered Subcompartments: Assembly and Loading with Hydrophobic Cargo*. Adv. Funct. Mater., 2010. **20**: p. 8.
 215. Hosta-Rigau, L.C., S. F.; Postma, A.; Chandrawati, R.; Städler, B.; Caruso, F., *Capsosomes with 'Free-Floating' Liposomal Subcompartments*. Adv. Mater., 2011. **23**.
 216. Kulygin, O.P., A. D.; Chong, S.-F.; Städler, B.; Zelikin, A. N.; Caruso, F., *Subcompartmentalized Polymer Hydrogel Capsules with Selectively Degradable Carrier and Subunits*. Small, 2010. **6**.
 217. Städler B, C.R., Price AD, Chong SF, Breheney K, Postma A, Connal LA, Zelikin AN, Caruso F., *A microreactor with thousands of subcompartments: enzyme-loaded liposomes within polymer capsules*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2009. **48**(24): p. 3.
 218. Rayleigh, L., *On the Electromagnetic Theory of Light*, Philos. Mag., 1881. **5**(12): p. 20.
 219. Debye, P., *Zur Theorie der spezifischen Waerme*. Annalen der Physik, 1912. **39**(4): p. 789.
 220. Mie, G., *Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen*. Vol. 330. 1908, Leipzig: Ann.Phys. 377.
 221. Smoluchowski, M., *Molekular-kinetische Theorie der Opaleszenz von Gasen im Kritischen Zustande sowie einiger verwandter Erscheinungen*. Ann. d. Phys., 1908. **25**: p. 21.
 222. Einstein, A., *Theorie der Opaleszenz von Homogen Flüssigkeiten und Flüssigkeitsgemischen in der Nähe des Kritischen Zustandes*. Ann. d. Phys., 1910. **IV**(33): p. 23.
 223. Zwanzig, *On the Validity of the Einstein-Smoluchowski Theory of Light Scattering*. J.Am.Chem.Soc., 1964. **86**: p. 4.
 224. Cummins, H., *Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry*. Plenum Press. 1977, New York.

-
225. Siegert, A., *On the Fluctuations in Signal Returned by Many Independently Moving Scatters*, ed. M.R. Lab.Rep. 1943. 465.
226. Pecora, R., *Dynamic Light Scattering, Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. Plenum Press. 1985, New York.
227. Berne, B.P., R., *Dynamic Light Scattering*. John Wiley. 1976, New York.
228. Fourier, J.B., *Fourier, J. B. Joseph (1822), Théorie Analytique de la Chaleur, Paris*. 1822, Paris.
229. Xu, R., *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Kluwer Academic Publishers, 2000.
230. Koppel, D., *Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants*. The Journal of Chemical Physics, 1972. **57**(11): p. 4814.
231. Frisken, B., *Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data*. Applied Optics, 2001. **40**(24): p. 4.
232. Provencher, S.S., P., *Global Analysis of Dynamic Light Scattering Autocorrelation Functions*. Part. Syst.Charact., 1996. **13**: p. 3.
233. Provencher, S., *CONTIN. A General Program for the Regularized Solution of Linear Integral Equations*. Comput. Phys.Com., 1982. **27**: p. 16.
234. Gohy, J.V., K.;Robert.J., *Water-Soluble Complexes Formed by Poly(2-vinylpyridinium)-block-poly(ethylene oxide) and Poly(sodium methacrylate)-block-poly(ethylene oxide) Copolymers*. Macromolecules, 2001. **34**(10): p. 3361.
235. Glatter, O.K., O., *Small Angle X Scattering* Academic Press. 1982, London.
236. Cantú, L.C., M.;Del Favero,E.;Dubois,M., *Combined Small Angle X-ray and Neutron Scattering Experiments for Thickness Characterization of Ganglioside Bilayers*. J.Phys.Chem., 1998. **B102**: p. 6.
237. McCarthy, D.W.M., J.E.; Schaefer,D., *Synthesis, Structure and Properties of Hybrid Organic-Inorganic Composites based on Polysiloxanes I. Poly(dimethylsiloxane) elastomers containing silica*. Polymer Science B: Polymer Physics, 1998. **36**(7): p. 22.
238. Guinier, A.F., G., *small Angle Scattering of X-rays*. 1955, New York: Wiley.
239. Sverguin, D.I.K., M., *Small-angle Scattering Studies of Biological Macromolecules in Solution*. Reports on Progress in Physics, 2003. **66**(10): p. 47.
240. Semenyuk, A.V.S., D.I., *GNOM- a Program Package for Small Angle Scattering Data Processing*. Journal of Applied Crystallography, 1991. **24**(5): p. 3.
241. Oliveira Neto, M., *Espalhamento de Raios X a Baixo ângulo Aplicado ao Estado Structural de Proteínas*, in *Instituto de Física de São Carlos*. 2008, Universidade de São Paulo: São Carlos.

242. Glatter, O., *A New Method for the Evaluation of Small Angle Scattering Data*. Journal of Applied Crystallography, 1977. **13**(2): p. 7.
243. More, P.B., *Small-angle Scattering. Information Content and Error Analysis*. Journal of Applied Crystallography, 1980. **13**(2): p. 7.
244. Silva, V.A., *Mecanismo de ação de Adjuvantes de Enovelamento Proteico: Modulação Conformacional da proteína apomiosglobulina como Sistema Modelo.*, in *Faculdade de Farmácia*. 2006, Universidade Federal do rio de Janeiro: Rio de Janeiro.
245. Bosch, P.L., v.H., *Difracción y Fluorescencia de Rayos X para Químicos. Materiales Policristalinos*. . Terracota. 2010, Mexico D.F.
246. de Gennes, P.P., R., *Remarks on Polyelectrolyte Conformation*. J.de Phys., 1976. **37**: p. 12.
247. Hayter, J.J.B.-W., P.; de Gennes, P., *Correlations and Dynamics of Polyelectrolyte solutions*. J.de Phys. Lett., 1980. **41**: p. 3.
248. Schull, R., *Proceedings of the Symposium on Engineering of Nanostructured Materials*. J. Nanostructured Materials 1993. **2**: p. 3.
249. Brockhouse, B.N.A., T.; Caglioti, G.; Rao, K. R.; Woods, A. D., *Crystal Dynamics of Lead I. Dispersion Curves at 100K*. Physical Review, 1962. **128**(3): p. 12.
250. Cotton, J.F., G.; Jannick, J., J.Chem.Phys., 1972. **57**.
251. Stuhmann, H.M., A., *Small Angle Scattering of Biological Structure*. J.Appl.Crystallogr., 1978. **11**: p. 20.
252. Jacrot, B., *The Study of Biological Structures by Neutron Scattering from Solution*. Reports on Progress in Physics, 1976. **39**(10): p. 42.
253. Lefmann, K., *Neutron Scattering: Theory, Instrumentation, and Simulation*. 2010, Niels Bohr Institute,.
254. Vestergaard, B.H., S., *Application of Bayesian Analysis to Indirect Fourier Transformation in Small-angle Scattering*. Journal of Applied Crystallography, 2006. **39**: p. 7.
255. Glatter, O., *The Inverse Scattering Problem in Small Angle Scattering, in Neutrons, X-Ray and Light Scattering. Methods Applied to Soft Condensed Matter*. Elsevier North -Holland ed. 2002, Holland.
256. Cherdhirankorn, T.H., V.; Juhari, A.; Voudouris, P.; Fytas, G.; Kremer, K.; Koynov, K., *Fluorescence Correlation Spectroscopy Study of Molecular Probe Diffusion in Polymer Melts*. Macromolecules, 2009. **42**: p. 8.
257. Rigler, R.M., U. Widengren, J., *Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low Background: Analysis of Translational Diffusion* European Biophysics Journal, 1993. **22**: p. 6.
258. Skoog, e.a., *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. 2007.
259. Porod, G., *Small Angle X-ray Scattering*, in *Small Angle X-ray Scattering*, O.K. Glatter, O., Editor. 1982, Academic Press: London. p. 17-51.

260. Ohshima, H.F., K., *Electrical Phenomena at Interfaces. Fundamentals, Measurements and Applications*. 1998, New York: Marcel Dekker.
261. Hunter, R.J., *Zeta Potential in Colloids Science: Principles and Applications*. 1981, London: Academic Press.
262. Evans, D.F.W., H., *The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*. 1999, New York: Wiley-VCH.
263. Salager, J.L., *Cuaderno FIRP S122-N*. 2002, Venezuela: Universidad de los andes.
264. Von Smoluchowski, M.Z., *Versuch einer mathematischen theory der koagulationskinetic kolloider loEsungen*. Physical Chemistry, 1918. **92**.
265. Hückel, E., *Die Kataphorese der Kugel*. Phys. Z., 1924. **25**.
266. Henry, D.C., *The Cataphoresis of Suspended Particles. Part I. The Equation of Cataphoresis*. Proc. R. Soc. Lond., 1931. **133**.
267. Doppler, C.A., *Über das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels*. Abh Königl Böhm Ges Wiss, 1843. **2**: p. 17.
268. Ltd., M.I., *Zeta Sizer Manual*. 1993, U.K.
269. TC So, P.D., Ch., *Fluorescence Spectrophotometry*, in *Encyclopedia of Life Sciences*. 2002, Mcmillan Publishers Ltd. Nature publishing group.: Masschusetts. p. 4.
270. Einstein, A., *Zur theorie der brownischen bewegung*. Ann. Physik, 1906. **19**: p. 10.
271. Kevin L. B., T.L., Klebe R. and Horowitz P., *Flourescence Polarization : A General Method for Measuring Ligand Binding and Membrane Microviscosity*. Biotech., 1985. **3**: p. 10.
272. G., K.A.a.W., *Flourescence Polarization studies on binding of 4-methylumbelliferyl beta-Dgalactopyranoside to Ricinus Communis agglutinin*. Biochemistry, 1982. **191**: p. 5.
273. Einstein, A., *Emission and Absortion of radiation according to the quantum theory*. Verh. Deutsch. Phys. Ges. , 1916. **18**.
274. Maliwal, L.J.R.a., *Oxigen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins*. J. Biol. Chem., 1983. **258**: p. 7.
275. Weber, G., *Rotacional brownian motion and polaritation of the flourescence of solutions*. Adv. Prot. Chem., 1953. **8**: p. 22.
276. Perrin, F., *Polarisation de la lumière de fluoresscence. Vie moyenne des molécules dans l'etat excité*. J.Phys.Radium V, 1926. **6(7)**: p. 11.
277. <http://www.upc.edu/pct/es/equip/322/espectrofotometro-fluorescencia-fluorimetro.html>.
278. Clay, R.C., T., *The History fof the Microscope*. 1975: Holland Press.
279. Goldstein, D., *Interference Microscope*. AccessScience. 2008: McGraw-Hill Companies.
280. www.olympusmicro.com.
281. Lang, W., *Nomarski Differential Interference–contrast Microscopy*. Zeiss Inform., 1969: p. 70-71.

282. http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/t5_5.htm.
283. Minsk, M., *Microscopy Apparatus*. 1957.
284. Art, J.G., M., *Rapid Scanning Confocal Microscopy. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. . 1993: Academic Press, Inc.
285. Petran, M.H., M; Egger, M.; Galambos, R., *Tandem Scanning Reflected Light Microscope*. J. Opt. Soc. Am., 1968. **58**: p. 4.
286. Boyde, A., *Confocal Optical Microscopy. Microscopy and Analysis*. Enero, 1998: p. 6.
287. Sheppard, C., *Confocal Microscopy-Principles, Practice and Options. Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity*. Academic Press ed. 1993.
288. Wright, S.J.C., V.; Stricker, E. et al., *Introduction to Confocal Microscopy and Three-Dimensional Reconstruction. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, ed. A. Press. 1993.
289. Bendersky L. and Gayle, F., *Electron Diffraction Using Transmission Electron Microscopy*. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 2001. **106**: p. 15.
290. de Broglie, L., *Nobel Lecture: The Wave Nature of the Electron*. The Nobel Foundation, 1929.
291. Abbe, E., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung I. Die Construction von Mikroskopen auf Grund der Theorie*. Archiv für Mikroskopische Anatomie, 1873. **9**(1): p. 5.
292. Rolf E.; Rossell, M.K., C; Dahmen, U, *Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe*. Physical Review Letters, 2009. **102**(9).
293. Fultz, B.a.H., J., *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. Springer, 2007.
294. <http://hypertextbook.com/facts/2000/IlyaSherman.shtml>.
295. Cecil, E., *Microscopia Electrónica*. 1970: Mc Graw Hill Barcelona.
296. Bogotá, U.p.j.d. <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/microelectrans.htm>.
297. Barlett, B.a., *Electron microscopy. Principles and techniques for biologists*. 1997, London, UK: Jones and Barlett publishers. 34.
298. Vilee, C., A., *Biología*. 2nd ed. 1992, Mexico: McGraw Hill.
299. Williams, D.C., C., *Transmission Electron Microscopy*. 2004, New York: Plenum Press.
300. www.ocw.um.es/gat/contenidos/ubero/microscopia/.
301. Dubochet, J.A., M and col., *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Q Rev. Biophys., 1988. **21**: p. 1.
302. Llorca O, M.E., Hynes G, Grantham J, Cordell J, Carrascosa JL, Willison KR, Fernandez JJ, Valpuesta JM (*Eukaryotic type II chaperonin CCT interacts with actin through specific subunits*. Nature, 1999. **402**: p. 3.

-
303. Ditzel L, L.J., Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, Steinbacher S, *Ditzel L, Löwe J, Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, Steinbacher S*. Cell, 1998. **93**: p. 13.
304. Auerbach, *Das Zeisswerk und die Karl Zeiss-Stiftung in Jena*. 3rd ed. 1907: Jena.
305. <http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/info/cryosem/>.
306. Wikipedia.
http://en.wikipedia.org/wiki/Environmental_scanning_electron_microscope. 2011.
307. http://en.wikipedia.org/wiki/Focused_ion_beam.
308. <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/nanomaterials-and-nanodevices-synthesized-by-ion-beam-technology-nanotechnology/>.
309. Zeiss, C., *Instruction Manual AURIGA Series*. AURIGA series. Modular CrossBeam workstation, 2004.
310. http://www.aandd.jp/products/test_measuring/eb/eb.html.
311. Santeufemio, C., *Report about crio-SEM 2010*, UMASS.
312. Lu, C.C., A. W., *Applications of piezoelectric quartz crystal microbalance*. Elsevier. 1984, Amsterdam.
313. Sauerbrey, G., *Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Microwagung*. Z.Phys., 1959. **155**: p. 6.
314. Solís, E.G., *Ensamblaje Electrostático de Sistemas Poliméricos Cargados: Fabricación y Propiedades*, in *Departamento de Química-Física I*. 2009, Universidad Complutense de Madrid: Madrid, España.
315. Spencer, W.a.S., W., *Precision Quartz Crystal Controlled Oscillator for Severe Environmental Conditions*. Frequency Control, 1962: p. 15.
316. Anderson TH, M.Y., Weirich KL, Zeng H, Fygenson D, Israelachvili JN., *Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates*. Langmuir, 2009. **25**(12): p. 8.
317. Johannsmann, D.M., K.; Wegner, G.; Knoll, W., *Viscoelastic properties of thin-films probed with a Quartz-Crystal Resonator*. Physical Review B, 1992. **46**: p. 7.
318. Rodahl, M.H., F.; Fredriksson, C.; Keller, C. A.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B., *Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion*. Faraday Discussions, 1997: p. 17.
319. Lourakis, M., *A Brief Description of the Levenberg-Marquardt Algorithm Implemened by levmar*. 2005: p. 3.
320. Levenberg, K., *A method for the solution of certain problems in least squares*. Quart. Appl. Math, 1944. **2**: p. 4.
321. Marquardt, D., *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. SIAM J. Appl. Math, 1963. **11**: p. 10.
322. Rothen, A., *The ellipsometer, an apparatus to measure thicknesses of thin surface films*. Rev. Sci. Instrum, 1945. **26**: p. 4.

323. Fujiwara, H., *Spectroscopy Ellipsometry. Principles and Applications*. 2007: Wiley.
324. Azzam R.M.A.; Bashara, N.M., *Ellipsometry and Polarized Light*. North Holland. 1977, Amsterdam.
325. Harland, G.a.E.A., *Handbook of Ellipsometry*. 2005, United States of America: Springer-Verlag.
326. Palik, E., *Handbook of Optical Constant of Solids*. 1985, Amsterdam: Academic Press Inc.
327. Drude, P., *The Theory of Optics*. Longmans, Green and Co. 1901, New York.
328. Fakhraai, Z.V., S.; Forrest, J. A., *Qualitative Discrepancy Between Different Measures of Dynamic in Thin Polymer Films*. . The European Physical Journal, 2005. **18**: p. 5.
329. Bertsekas, D., *Nonlinear Programming*. Athenas Scientific. 1999, Belmont.
330. Zelikin, A.Q., L.;Caruso,F., *Disulfide cross-linked polymer capsules: en route to biodeconstructible systems*. Biomacromolecules. **7**: p. 3.
331. Barlett, G., *Phosphorus Assay in Column Chromatography*. J. Biol. Chem, 1958. **234**(3): p. 2.
332. Rouser G, F.S., Yamamoto, A., *Two-dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots*. Lipids, 1970. **5**: p. 2.
333. Stewart, J., *colorimetric determiantion of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate*. Anal Biochem., 1980. **104**(1): p. 6.
334. Chandrawati, R.H.-R., L.; Vanderstraaten, D.; Lokuliyana, S. A.; Städler, B.; Albericio, F.; Caruso, F., *Engineering Advanced Capsosomes: Maximizing the Number of Subcompartments, Cargo Retention, and Temperature-Triggered Reaction*. ACS Nano 2010. **4**.
335. Montgomery, K., L. Raymundo, Jr., and W.L. Drew. , *Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria*. Journal of Clinical Microbiology, 1979. **9**: p. 2.
336. Jorgensen, J.H., S.A. Crawford, and G.A. Alexander. , *Pyridine-2-azo-p-dimethylaniline chromophore, a new chromogenic cephalosporin for rapid beta-lactamase testing*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1982. **22**: p. 2.
337. Dinsmore, A.D.e.a., Science, 2002. **296**.
338. Subramanian, A.B.A., M. and H. A. Stone Nature Mat. Lett., 2005. **4**.
339. Zeng, C.B., H. and Dinsmore, A.D. and (2006);, Solid State Comm. , 2006. **139**.
340. Pitard, E.R., M. L. ; Stell, G.and Tarjus, G. , Phys. Rev. Lett., 1995. **74**.
341. Cantat, I.M.C.-A., S; Elias, F.; Graner, F.; Hohler, R.; Pitois, O.; Rouyer,F. and Saint-Jalmes,A., *Les mousses: structure et dynamique* 2010, Berlin.
342. Bon, S.A.F.a.C., T. , Langmuir, 2007. **23**.

-
343. Lee, R.F., *Spill Science and Technology Bulletin* 1999. **5**.
344. Dickinson, E., *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2010. **15**.
345. Rousseau, D.G., S.; and H. Park, H., *Journal of Food Science* 2009. **74**.
346. Lu, S.P., R.J.;and Forssberg, E., *In interfacial separation of particles*, Elsevier, Editor. 2005: Amsterdam.
347. Frelichowska, J.B., M. A.; Pelletier, J.; Valour, J.P. and Chevalier, Y., *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. **371**.
348. Hansen, P.H.F.R., S. and Bergstrom, L., *Langmuir*, 2001. **17**.
349. Pieranski, P., *Phys. Rev. Lett.* , 1980. **45**.
350. Aveyard R. et al., *ibid*, 2002. **8**.
351. Leunissen M.E. et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007. **104**.
352. Masschaele, K.P., B.J.; Furst, E. M. ;Fransaer, J. and Vermant, J. *Phys. Rev. Lett.* , 2010. **105**.
353. Guzowski, J.T., M. and S. Dietrich, S. *Phys. Rev.* , 2011. **E84**.
354. Sabín, J.P., G.; Ruso, J.M.; Hidalgo-Álvarez, R.; Sarmiento, F., *Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces*. *Eur. Phys. J.E.*, 2006. **20**: p. 7.
355. Böttcher, C.v.G., C.M.; C. Pries,C., *A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination*. *Anal Chem. Acta*, 1961. **24**: p. 1.
356. J.M., M.S.a.S., *Highsensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems*. *Methods Membr. Biol.*, 1978. **9**.
357. Chapman, B.D.a., *Biological Microcalrimetry Beeper*, ed. A.E. 1980, London: Academic Press.
358. Brown, M.E., *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. 1998, Amsterdam: Elsevier.
359. C.T., M.J.L.a.M., *Calorimetría Diferencial de Barrido*. 1975: Perkin Elmer Corporation.
360. Hasanovic, A.H., S.; Valenta, C., *Analysis of skin penetration of phytosphingosine by fluorescence detection and influence of the thermotropic behaviour of DPPC liposomes* *Int. J. Pharm.*, 2010. **383**: p. 3.
361. Lentz, B.B., Y.;Thompson, E., *Fluorescence Depolarization Studies of Phase Transitions and Fluidity in Phospholipid Bilayers. 1. Single Component Phosphatidylcholine Liposomes*. *Biochemistry*, 1976. **15**(20).
362. C. Gao, E.D., S. Moya, V. Dudnik and H. Möhwald, *Elasticity of hollow polyelectrolyte capsules prepared by the layer-by-layer technique*. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological physics*, **2001**. **5**(1): p. 6.

363. Wiener, M.C.a.W., S.H., *Fluid bilayer structure determination by the combined use of ray-X and neutron diffraction.1. Fluid bilayer models and the limits of resolution*. Biophys J., 1991. **59**: p. 23.
364. Pencer, J. *XII International Conference on SAS*. 2002. Venice.
365. McConnell, H.M.W., T.H.; Weis, R.M.; Brian, A.A., *Supported planar membranes in studies of cell-cell recognition*. Biochimica Et. Biophysica, 1986. **864**: p. 11.
366. Seifert, U., *Configurations of fluid membranes and vesicles*. Adv. Phys., 1997. **46**: p. 124.
367. Dimitrievski, K.K., B., *Simulations of lipid vesicle adsorption for different lipid mixtures*. Langmuir, 2008. **24**: p. 14.
368. Dimitrievski, K.R., E.; Kasemo, B.; Zhdanov, V.P., *Simulations of temperature dependence of the formation of a supported lipid bilayer via vesicle adsorption*. Colloids and Surfaces Biointerface, 2004. **39**: p. 9.
369. Zhdanov, V.P.K., C.A.; Glasmaster, K.; Kasemo, B., *Simulation of adsorption kinetics of lipid vesicles*. J.Chem.Phys., 2000. **112**: p. 9.
370. Jass, J.T., T.; Puu, G., *From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: An atomic force microscopy study*. Biophys J., 2000. **79**: p. 10.
371. Reimhult, E.Z., M.; Hook, F.; Kasemo, B., *A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂*. Langmuir, 2006. **22**(6): p. 3313.
372. Richter, R.P.B., R.; Brisson, A.R., *Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view*. Langmuir, 2006. **22**: p. 8.
373. Richter, R.L.K.H., J; Brisson,A., *Supported lipid membranes*. Materials Today, 2003. **6**(11): p. 5.
374. Richter, R.L.K.H., J; Brisson,A., *Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study*. Biophys J., 2003. **85**: p. 12.
375. Puu, G., and I. Gustafson, *Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes - factors of importance for kinetics and stability*. Acta Biomembr., 1997. **1327**: p. 12.
376. Aspmes, D.E.T., J.B., *Investigation of effectivemedium models of microscopic surface-roughness by spectroscopic ellipsometry*. Phys. Rev. B., 1979. **20**: p. 10.
377. Howland, M.S., A.;Sanii,B.;Parikh,A., *Characterization of Physical Properties of Supported Phospholipid Membranes Using Imaging Ellipsometry at Optical Wavelengths*. Biophys J., 2007. **92**: p. 11.
378. Guzmán, E.C.-J., R.; Ortega F.; and Rubio, R., *Influence of the percentage of acetylation on the assembly of LbL multilayers of poly(acrylic acid) and chitosan*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2011. **13**: p. 207.
379. Guzmán, E.R., H.; F. Rubio, J.E.; G. Rubio,R. and Ortega F., *Salt-induced changes in the growth of polyelectrolyte layers of*

- poly(diallyl-dimethylammonium chloride) and poly(4-styrene sulfonate of sodium)*. Soft Matter, 2009. **5**: p. 12.
380. Tompkins, H.G., *A User's Guide to Ellipsometry*. 1993, San Diego: Academic Press Inc.
381. J.C. Dijt, M.A.C.S., G.J. Fleer, *Kinetics of polymer adsorption and desorption in capillary flow*. Macromolecules, 1992. **25**: p. 8.
382. Viitala T, H.J., Vuorinen J, Wiedmer SK. , *Structure of anionic phospholipid coatings on silica by dissipative quartz crystal microbalance*. . Langmuir, 2007. **23**: p. 9.
383. Guzmán, E.R., H.; Ortega, F.; G. Rubio, R., *Evidence of the influence of adsorption kinetics on the internal reorganization of polyelectrolyte multilayers*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects., 2011. **384**(1-3): p. 7.
384. Vörös, J., *The Density and Refractive Index of Adsorbing Protein Layers*. Biophys J., 2004. **87**(1): p. 8.
385. Johannsmann, D.M., K.; Wegner, G.; Knoll, W., *Derivation of the shear compliance of thin films on quartz resonators from comparison of the frequency shifts on different harmonics: A perturbation analysis*. J. Appl. Phys., 2001. **89**(11): p. 9.
386. Guzmán, E.A.C., J.; Chuliá-Jordán, R., *pH-Induced Changes in the Fabrication of Multilayers of Poly(acrylic acid) and Chitosan: Fabrication, Properties, and Tests as a Drug Storage and Delivery System* Langmuir, 2011. **27**(11): p. 9.
387. Höök, F.R., M.; Brzezinski P.; and Kasemo, B., *Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance*. Langmuir, 1998. **14**: p. 5.
388. Larsson, R., *The Structure and Rheology of Complex Fluids* 1999, Oxford: Oxford University Press.
389. Guzmán E, R.H., Ortega F, Svitova T, Radke CJ, Rubio RG., *Adsorption kinetics and mechanical properties of ultrathin polyelectrolyte multilayers: liquid-supported versus solid-supported films*. J.Phys. Chem B., 2009. **113**(20): p. 9.
390. Wong, J.E.R., F.; Haenni, P.; Tanaka, M. 2004, 37, 7285., Macromolecules, 2009. **42**(4): p. 9.
391. Tan, B.T., K., Adv. Colloid Interface Sci., 2008. **136**.
392. Wong, J.E.R., W., Prog. colloid Polym. Sci., 2006. **133**.
393. Stieger M.; Pedersen, J.L., P.; Richtering, W., Langmuir, 2004. **20**.
394. Pelton, R., Macromolecular Symp., 2004. **207**.
395. Saunders. B.R.; Vincent, B., Adv. Colloid Interface Sci., 1999. **80**.
396. Maeda, Y.Y., H.; Ikeda I. , *Effects of ionization of incorporated imidazole groups on the phase transitions of poly(N-isopropylacrylamide), poly(N,N-diethylacrylamide), and poly(N-vinylcaprolactam) in water* Langmuir, 2001. **17**(22): p. 4.

397. Van Durme, K.R., H.; Van Mele, B., *Macromolecules*, 2005. **28**(10155).
398. Wong, J.E.R., F.; Haenni, P.; Tanaka, M. 2004, 37, 7285. and [17], *Macromolecules* 2004. **37**(7285).
399. Saunders, B.C., H., *Macromolecules*, 1997. **30**.
400. Wong, J.E.R., W., W. *Current Opin. Colloid Interface Sci.*, 2008. **13**.
401. Oshima, H., *Colloid Polym. sci.*, 2007. **285**.
402. De Geest, B.D., C.; Jonas, A., *J Controlled Release*, 2006. **116**.
403. Zhang, Y.R., W. C.; Leduc, P. R., *Artificial cells: building bioinspired systems using small-scale biology*. Trends in Biotechnology 2008. **26**(1): p. 6.
404. Van Dongen, S.F.M.N., M.; Cornelissen, J.; Nolte, R. J. M.; van Hest, J. C. M, *A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor*. Chemistry-a European Journal 2009. **15**(5): p. 14.
405. Long, M.S.J., C. D.; Helfrich, M. R.; Mangeney-Slavin, L. K.; Keating, C. D, *Dynamic microcompartmentation in synthetic cells*. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(17): p. 5.
406. Noireaux, V.B.-Z., R.; Godefroy, J.; Salman, H.; Libchaber, A., *Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles*. . Physical Biology 2005. **2**(3): p. 7.
407. Helmuth Möhwald¹, H.L., S. Moya¹, Andreas Voigt¹, H. Bäuml², Gleb Sukhorukov¹, Frank Caruso¹, Edwin Donath¹, *From polymeric films to nanoreactors*. Macromolecular Symposia, 2011. **145**(1): p. 75-81.
408. Quinn J.; Johnston, A.S., S.; Zelikin, A.; Caruso, F., *Next generation, sequentially assembled ultrathin films beyond electrostatics*. Chem Soc. Rev, 2007. **36**: p. 11.
409. De geest, B.S., N.; Sukhorukov, G.; , *Release mechanisms for polyelectrolyte capsules*. chem Soc. Rev., 2007. **36**: p. 13.
410. Hosta-Rigau, L.C., R.; Saveriades, E.; Odermatt, P. D.; Postma, A.; Ercole, F.; Breheney, K.; Wark, K. L.; Städler, B.; Caruso, F, *Noncovalent Liposome Linkage and Miniaturization of Capsosomes for Drug Delivery*. Biomacromolecules, 2010. **11**.
411. Chandrawati, R.C., S.-F.; Zelikin, A. N.; Hosta-Rigau, L.; Städler, B.; Caruso, F., *Degradation of Liposomal Subcompartments in PEGylated Capsosomes*. Soft Matter, 2011. **7**.
412. Shimoni, O.P., A.; Yan, Y.; Scott, A. M.; Heath, J. K.; Nice, E. C.; Zelikin, A. N.; Caruso, F. , *Macromolecule Functionalization of Disulfide-Bonded Polymer Hydrogel Capsules and Cancer Cell Targeting*. Macromolecule Functionalization of Disulfide-Bonded Polymer Hydrogel Capsules and Cancer Cell Targeting, 2012. **6**.
413. Wang, Y.Y., Y.; Cui, J.; Hosta-Rigau, L.; Heath, J. K.; Nice, E. C.; Caruso, F, *Encapsulation of Water-Insoluble Drugs in Polymer*

-
- Capsules Prepared Using Mesoporous Silica Templates for Intracellular Drug Delivery*. Adv. Mater., 2010. **22**.
414. Childers, N.M., S.; Eldridge, J.; Denys, F.; Berry A.; McGhee, J., *Characterization of liposome suspensions by flow cytometry*. Journal of Immunological methods, 1989. **119**(21): p. 8.
415. Desjardins, P.H., J.; Allen, M., *Microvolume Spectrophotometric and Fluorimetric Determination of Protein Concentration*. Protein Science. **3**(10): p. 2.
416. Becker, A.Z., A. Johnston, A.; Caruso, F., *Tuning the formation and degradation of layer-by-layer assembled polymer hydrogel microcapsules*. Langmuir, 2009: p. 4.

9 ANEXOS

9.1 ABREVIATURAS

- ALV: Laser Vertriebsgesellschaft mbH
- BM(PEG)₂: Bis-maleimida poli-etilenglicol
- CLSM: Microscopía Confocal de fluorescencia
- Crio-SEM: crio- Microscopía electrónica de emisión
- Crio-TEM: crio- Microscopía electrónica de transmisión
- DEX-FITC: Dextrano con fluoresceína de isotiocianato
- DIC: Microscopía de contraste interdifereencial
- DLS: Dispersión de luz dinámica
- DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
- DODAB: Bromuro de dioctadecil dimetil amonio
- DOPC: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
- DOPS: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-serina (en sal sódica)
- DOX: Doxorubicina
- DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-Lcolina-serina
- DPPS: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
- DSC: Calorimetría diferencial
- HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
- GSH: Glutathiona
- LUV: Vesículas unilamelares grandes
- MES: Ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico
- MOPS: Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
- NaCl: Cloruro sódico
- NBD-PC: 1- Me encanta empezar los lunes deseándote un feliz díamiristoil-2-(12-((7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il(amino)lauroil)-sn-glicero-3-fosfocolina.
- PAH: Poli(alilamina)
- PBS: Disolución salina tamponada de fosfato de sodio y de potasio.
- PDADMAC: cloruro de poli(dialil-dimetilamonio)
- PEI: polietilenamina
- PGA: Ácido poliglutámico

- PLL: Poli(lisina)
- PMA: Ácido polimetacrílico
- PMA_{SH}: Ácido polimetacrílico con grupos tioles
- PMA_c: Ácido polimetacrílico con cadenas de colesterol.
- p-(NIPAM): Poli(N-isopropilacrilamida)
- p-(NIPAM)-COOH: Poli(N-isopropilacrilamida), con cadenas de ácido carboxílico en posiciones terminales.
- p-(NIPAM)-co-VI: Poli(N-isopropilacrilamida) con vinil amidizol.
- PSS: Poli(4-estirensulfonato) de sodio
- PVP: poli vinil pirrolidona
- SUV: Vesículas unilamelares pequeñas
- QCM: Balanza de cuarzo
- SANS: Dispersión de rayos X de bajo ángulo
- SAXS: Dispersión de neutrones de bajo ángulo
- TEM: Microscopía electrónica de transmisión
- T_m : Temperatura de transición
- TRIS: Tris(hidroximetil)amino-metano
- TRITON-X: Poli(etilenglicol) p(1,1-3,3-tetrametil) fenil éter
- UV-Vis: Ultravioleta-visible

9.2 LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1	Formación de materiales <i>core-shell</i> y microcápsulas por ensamblaje electrostático capa a capa de polielectrolitos ^[29, 30] . Una partícula de sílice es recubierta por interacciones electrostáticas con polielectrolitos y posteriormente se elimina la partícula plantilla dando lugar a una cápsula polimérica.	17
Figura 1.2	Clasificación estructural de los lípidos ^[3] . Se distinguen lípidos de almacenamiento de energía como los triglicéridos y los lípidos de membrana como los fosfolípidos y glicolípidos.	18
Figura 1.3	Estructura típica de la fosfolipina formada por una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba.....	19
Figura 1.4	Fases del lípido en función de la temperatura. El cambio de fase se debe a un desorden de las cadenas hidrocarbonadas que forman parte de los lípidos debido a un cambio de temperatura ^[25, 26]	20
Figura 1.5	Determinación del área óptimo de las cabezas polares, a_0 , mediante el balance entre las fuerzas interfaciales atractivas y las fuerzas repulsivas entre las cabezas polares.	27
Figura 1.6	a) Representación esquemática de una bicapa de lípidos. b) Representación de una vesícula unilamelar ^[9] formada por una bicapa de lípidos. c) Representación de una micela formada por una monocapa de fosfolípidos.	31
Figura 1.7	Variables que interviene en la aproximación de Derjaguin para dos partículas próximas de radio R_A y R_B , respectivamente.	37
Figura 1.8	Diferentes tipos de vesículas: SUV o vesículas unilamelares pequeñas, LUV o vesículas unilamelares grandes y MLV ^[27, 28] o vesículas multilamelares.	41
Figura 1.9	Procedimientos para la obtención de liposomas. El método de dispersión simple para obtener MLV. A partir de ellos, el método de extrusión para obtener SUV o el método de sonicación-homogeneización para obtener LUV ^[14]	44
Figura 1.10	Mecanismo de formación de un microgel cuya temperatura consoluta inferior, LCST, indica si ha absorbido agua mostrando una estructura hinchada o no denominándose microgel colapsado ^[16]	51
Figura 1.11	Diagrama de fases para el comportamiento de un microgel ideal con: a) temperatura consoluta superior o máxima a la que el microgel se calienta para que se disuelva (UCST) y b) temperatura consoluta inferior o mínima a la que hay que calentar para que el microgel no precipite (LCST) ^[12]	53
Figura 1.12	Diagrama de fases de p-(NIPAM) formado por dos regiones ^[12]	54

Figura 1.13	Esquema de la respuesta estimulada de los microgeles. Cuando la temperatura es mayor que VPPT o el pH es mayor que el pK_a del microgel, éste reduce su volumen, es decir, se colapsa.	55
Figura 1.14	Clasificación de los polielectrolitos atendiendo a su carga: a) policationes, b) polianiones y c) anfólitos ^[7]	58
Figura 1.15	Modelo de capas difusas: Las multicapas están representadas por un perfil de concentración de carácter sinusoidal (líneas negras) elegido arbitrariamente. Para un sustrato con carga positiva, las curvas más oscuras corresponden a las capas de polianión y las curvas más claras corresponden a las capas de policación.	63
Figura 1.16	Técnica LbL.a) Sobre una partícula se deposita un polielectrolito por interacción electrostática. (b) El polielectrolito de carga contraria es depositado sobre la primera capa formada. (c) El exceso de materia no adsorbida se elimina mediante ciclos de centrifugación antes del siguiente ciclo de adsorción. (d) Repetición de los pasos llevados en (a) y en (b) por la exposición repetitiva a polielectrolitos de carga alterna dando lugar a multicapas adsorbidas sobre la partícula ^[29, 31]	65
Figura 1.17	Ensamblaje de los capsosomas $PMA_c/(DMPC/DPPC)/PMA_c/PVP/(PMA_{SH}/PVP)_x$. Transformación de los enlaces de hidrógeno en puentes disulfuro por cambio de pH ^[13]	68
Figura 1.18	Estructura que adopta el polímero funcionalizado PMA_c cuando se adsorbe sobre un liposoma ^[11]	69
Figura 1.19	Comparación de una célula con la estructura de un capsosoma. i) Multicapas poliméricas que dan lugar a la membrana biológicamente biodegradable, i) Incorporación de lisosomas para la degradación de ADN y iii) Liposomas cargados con un fármaco hidrofóbico en su interior ^[17]	71
Figura 1.20	Híbridos formados por cápsulas poliméricas de 300 nm y liposomas de 50 nm y ambos recubiertos por cuatro bicapas de polímeros.	73
Figura 1.21	Obtención de una cápsula polimérica: LbL aplicada sobre una partícula de sílice utilizando el par de polielectrolitos PMA_{SH}/PVP y eliminación de la partícula con tratamiento de ácido y lavado posterior para mantenerlas a pH fisiológico ^[15]	74
Figura 2.1	Fenómeno de la dispersión. El plano de la dispersión viene dado por la radiación incidente (I_i) y la radiación dispersada (I_d), y ambas relacionadas mediante el ángulo de dispersión θ . La intensidad dispersada por el volumen de dispersión de la muestra varía con el tiempo y es esta fluctuación la que llega al detector.	82
Figura 2.2	(a) Esquema del equipo de dispersión ALV-5003. (b) Foto del mismo.	88
Figura 2.3	Equipo de dispersión de rayos X (SAXS) localizado en la universidad de Aachen (Alemania), RWTH.	92
Figura 2.4	Perfil de densidades obtenido según la técnica SAXS.	93
Figura 2.5	Curva de la intensidad dispersada en función de q en la que se distinguen las regiones marcadas y de las cuales se van a estudiar las de mayor interés para nuestros sistemas: Guinier y Porod.	94

- Figura 2.6 Clasificación según Kratky cuando se representa el producto del cuadrado del vector de onda por la intensidad dispersada con respecto al vector de onda. 96
- Figura 2.7 Esquema de un equipo de SANS en el reactor de Saclay. El vector de onda es de 1.2 nm y la distancia de la muestra al detector de 5 m para la obtención de valores de vectores de onda bajos. El detector es un multidetector de He en 2D y el colimador situado antes de la muestra es controlado al cambiar la posición muestra-detector. 100
- Figura 2.8 (a) Componentes principales de un citómetro de flujo formado principalmente por una serie de detectores, espejos reflectores y la fuente de luz láser. Los sistemas de inyección de muestra deben ser isovolumétricos que permita una velocidad constante. (b) Datos obtenidos del análisis de una muestra^[20] 102
- Figura 2.9 Fotografía del citómetro de flujo utilizado y esquema de los componentes principales. Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente.^[10] 103
- Figura 2.10 Distorsión del campo eléctrico aplicado sobre una partícula coloidal. a) para dobles capas finas, $\kappa_p a \gg 1$ o $a \gg 1$, existe una mayor proporción de iones de electrolito que experimentan un campo distorsionado. b) para dobles capas gruesas, $\kappa_p a \ll 1$ o $a \ll 1$, existe una mayor proporción de iones de polielectrolito que experimentan el campo original sin distorsionar^[19]. 105
- Figura 2.11 Componentes del equipo empleado para medir el potencial zeta. 107
- Figura 2.12 Célula de medida y esquema del proceso de medida por LDV. Representación del movimiento de los iones hacia los electrodos en la célula cuando se aplica un potencial, donde la velocidad de los iones es la velocidad electroforética. 108
- Figura 2.13 Principios básicos de la polarización por fluorescencia. Si la sonda tiene su orientación restringida debido a su localización provocará que la luz emitida sea siempre paralela a la luz de excitación. 111
- Figura 2.14 (a) Esquema del funcionamiento de un fluorímetro^[4]. 113
- Figura 2.15 Esquema de funcionamiento de un microscopio de contraste interferencial. Utiliza filtros de polarización, y prismas Wollaston para separar los caminos de luz que evita cualquier tipo de protocolo de preparación de la muestra^[5]. 115
- Figura 2.16 Principios de un microscopio confocal. Para obtener una imagen completa, el punto de luz es movido a través de la muestra con ayuda de espejos dicróicos. La luz emitida/reflejada pasa a través de la apertura pinhole y es transformado en señal eléctrica por un fotomultiplicador para poder ser leído en el ordenador^[8]. 116
- Figura 2.17 Principales componentes de un microscopio de transmisión. Se observa la fuente de electrones, el condensador, el objetivo, el magnificador y la cámara^[2]. 119
- Figura 2.18 Fotografía del microscopio electrónico JEOL JEM-1230 con una capacidad de operación de hasta 120kV. Tiene un bioescáner con cámara. La muestra se coloca en un portamuestras que debe ser

	criogenizado y para lo que se dispone de una cámara de criogenización.	121
Figura 2.19	(a) Equipo de crio-SEM en una columna GEMINI 4000 con una resolución de 1nm a 15 mV y una columna CANION para FIB con una resolución de 2.5nm a 30 mV. GIS es la estructura por la que se añade el gas para el recubrimiento para medidas con FIB. A través del controlador se obtienen imágenes para ambas técnicas. (b) Representación de cómo están dispuestas la columna SEM y FIB, el ángulo de separación de una con respecto a la otra está establecido en 54° ^[23, 24]	123
Figura 2.20	Preparación de muestras para crio-SEM y FIB. 1. Portamuestras tipo WSH-FLAT con anclajes para la fijar la muestra, con un volumen mínimo es de 1 µl de muestra que se ensambla en el dispositivo de transferencia. 2. Anclaje del portamuestras sobre el dispositivo de transferencia en la cámara de vacío. 3. Recubrimiento de platino sobre la muestra con un espesor mínimo de 5 nm para aumentar la conductividad de la muestra. 4. Transferencia de la muestra a la cámara de criogenización ensamblado al microscopio para el análisis de la muestra con el microscopio. Todos estos procesos han sido realizados en condiciones de muy baja temperatura pero constante en todo momento ^[18]	125
Figura 2.21	Esquema del funcionamiento de la QCM ^[6] . Por la entrada se introduce la disolución a estudiar y tras el tiempo necesario de estabilización se introduce el disolvente de lavado. La cantidad adsorbida antes y después del lavado es lo que se va a medir.	128
Figura 2.22	a) Cristal de cuarzo recubierto con dos electrodos de oro en la cara inferior y superior. (b) Funcionamiento de una balanza con electrodo de oro formando el circuito.	129
Figura 2.23	Esquema de un elipsómetro. Los ángulos que se obtienen del polarizador y del analizador se denominan como P y A, respectivamente ^[1]	132
Figura 2.24	Modelo de cuatro capas empleado para el análisis de los datos elipsométricos.	133
Figura 3.1	Fosfolípidos utilizados en este trabajo. La diferencia entre ellos radica principalmente en la existencia o no de dobles enlaces en su cadena y en el tipo de cabeza polar. Los nombres de los lípidos se dan en la Tabla 3.1.	136
Figura 3.2	Tensioactivos utilizados, DODAB para formar liposomas y TRITON X -100 para disolver los liposomas.	138
Figura 3.3	Polímeros utilizados para el recubrimiento de los liposomas por la técnica capa a capa.	139
Figura 3.4	Polielectrolitos sintetizados en el laboratorio. PMA _c o ácido de polimetacrilato con 12%w colesterol, M _w = 11560 Da; es un polímero con cadenas de colesterol que sirve para formar parte de la bicapa lipídica que forma los liposomas, es sintetizado por el Dr. Alexander Zelikin ^[13] . PMA _{SH} o ácido de polimetacrilato con 12-14%w grupos tioles que es otro polímero que se sintetiza en el laboratorio, pero que	

	debe obtenerse en el momento en que se va a utilizar ya que pierde actividad con el tiempo.	140
Figura 3.5	Reactivos utilizados para la fabricación del microgel donde (a) es el co-monómero VI, (b) es el NIPAM, (c) es BIS que actúa como entrecruzador, (d) es el surfactante, CTAB, (e) es V50 que actúa como iniciador de la polimerización.	142
Figura 3.6	Sondas fluorescentes, de las cuales FITC acompaña al fármaco encapsulado, Rodamina B (Sigma-Aldrich, contenido de sonda -95%) a los microgeles y NBD-PC (Avanti Lipids) es una fosfocolina con la sonda fluorescente verde NBD que facilita la observación de los liposomas con el microscopio de confocal	143
Figura 3.7	Estructura molecular de la doxorubicina y del dextrano	144
Figura 3.8	Estructura molecular del sustrato, nitrocefina que reacciona con β -lactamasa.	144
Figura 3.9	Entrecruzadores más utilizados en este trabajo. BM(PEG) ₂ es un reactivo homobifuncional no degradable y CAT, entrecruzador biodegradable. Ambos utilizados para formar enlaces disulfuro a partir de los enlaces -SH. DTT rompe los enlaces disulfuro formados para activar los enlaces -SH.	145
Figura 3.10	GSH o glutatona es un tripéptido compuesto de glutamato, cisteína y glicina que sirve como cofactor para algunas reacciones enzimáticas y ayuda en la reconfiguración de los enlaces disulfuro de las proteínas.	145
Figura 3.11	Disoluciones tampón utilizadas durante la tesis.	147
Figura 3.12	Esquema de la formación de vesículas paso por paso: preparación de la disolución, formación de la película, hidratación y extrusión.	149
Figura 3.13	Partes de un mini-extrusor y detalle del ensamblaje de cada una de ellas. Una vez ensambladas se coloca la pieza en el interior del estabilizador de temperatura donde van perfectamente sujetas las dos jeringuillas en cada uno de los extremos. Esto permitirá tener una temperatura constante durante todo el proceso de extrusión.	151
Figura 3.14	Extrusor tipo thermo barrel extruder de Northern Lipids con capacidad de 10 ml de muestra.	152
Figura 3.15	Síntesis del microgel p-(NIPAM)-co-VI que comienza con la mezcla de oligómeros para dar lugar a la partícula precursora y posteriormente el crecimiento que da lugar al microgel ^[21]	155
Figura 3.16	Formación de PMA con grupos tioles. Con la ayuda del EDC se activa el grupo -NH ₂ para rápidamente formará un enlace con el grupo carboxílico del PMA obteniendo una molécula con el número de grupos tioles deseados.	156
Figura 3.17	Formación de las cápsulas poliméricas vía la técnica LbL por interacciones electrostáticas. Una vez disuelta la partícula tras formar las capas, se obtiene una cápsula con coraza semipermeable que puede albergar diferentes sustancias.	158
Figura 3.18	Recubrimiento de liposomas con una primera capa de polielectrolito PSS y una segunda de PAH.	160

Figura 3.19	Esquema que muestra el proceso de ensamblaje para híbridos invertidos. De esta forma, sobre la partícula de sílice se añade la capa precursora de PMA _c seguido de la deposición de los liposomas y la siguiente adsorción secuencial de capas separadoras PMA _c y PLL. A continuación se añaden las cápsulas de 300 nm y se finaliza con el ensamblaje electrostático de los polímeros PVP/PMA _{SH} . Con un tratamiento de HF se consigue vaciar la partícula de sílice.....	163
Figura 3.20	Transformación estructural sufrida en la nitrocefina al ponerse en contacto con la enzima en disolución acuosa.	164
Figura 3.22	Reacción de GSH con capsula poliméricas de PMA _{SH} /PVP.	165
Figura 3.21	Ensayo enzimático que consiste en la liberación del fármaco que con el contacto del sustrato se produce el cambio de color de amarillo a rojo confirmando la encapsulación del fármaco en el interior de los liposomas.	165
Figura 4.1	Coloidosomas donde (a) representa la adsorción de liposomas unilamelares pequeños sobre la superficie de micropartículas de poliestireno y (b) la adsorción de nanopartículas de poliestireno sobre liposomas unilamelares pequeños.	169
Figura 4.2	(a) Variación del contenido en fósforo con respecto al % _m de DOPC presente en los sistemas estudiados. Análisis del contenido en fósforo de liposomas de carácter catiónico DOPC:DODAB con un tamaño de 100 nm, obtenidos mediante extrusión en disolución 10 mM de NaCl frente al porcentaje de DOPC en vesículas formadas por mezclas de DOPC:DODAB. La línea continua representa los valores esperados sin pérdidas. (b) Variación de las pérdidas después del proceso de extrusión. La línea discontinua representa el ajuste de los datos. ...	170
Figura 4.3	Variación de la distribución de tamaños en función de la intensidad a medida que aumenta el número de extrusiones para liposomas de Ø = 100 nm.	172
Figura 4.4	Función de correlación frente al tiempo de decaimiento medidas en las muestras obtenidas tras un número diferente de extrusiones.	173
Figura 4.5	Radio hidrodinámico R_H de las vesículas formadas por: (a) DOPC:DODAB (3:1) y (b) DOPC. Las medidas de DLS han sido realizadas a pH 7.4, a 25 °C y a un ángulo de dispersión de 90° utilizando membranas con diferente tamaño de poro. La línea azul para 100 nm, la línea negra para 200 nm y la línea roja para 400 nm.	174
Figura 4. 6	Variación del potencial zeta para liposomas formados por DOPC:DODAB con variación de concentración de DODAB. Medidas realizadas a temperatura ambiente, 25°C y en disolución salina 10 mM después de ser extruidos con un tamaño medio de 100 nm de diámetro.	175
Figura 4.7	Radio hidrodinámico normalizado para liposomas formados por DPPC extruidos en disolución tampón a pH 7.4. La curva roja se corresponde a liposomas de 100 nm de diámetro y la curva negra para liposomas de 1 µm obtenidos tras la extrusión a través de membranas de policarbonato del tamaño mostrado.	176

- Figura 4.8 Potencial zeta obtenido mediante movilidad electroforética en función del pH para determinar el punto isoelectrico en liposomas zwitteriónicos en disolución acuosa con concentración salina igual a 10 mM. El tamaño de los liposomas es 100 nm de diámetro y las medidas están realizadas a 25°C. Comparación con el punto isoelectrico observado para DPPC (■), DOPC (●) y DOPC:DPPC (30:70) (●). El círculo indica la región en la que se sitúa el IEP..... 177
- Figura 4.9 Calor liberado en liposomas de 1 μ m formados por DPPC (■) y encapsulando DOX (■). Los experimentos han sido relaiizados en disolución tamponada HEPES a pH 7.4 con fuerza iónica igual a 10 mM NaCl. 178
- Figura 4.10 Variación de la anisotropía, r , para liposomas formados por DPPC (■) y liposomas formados por DPPC:DOPC(■) en disolución tamponada a pH 7.4 y con una concentración de 10 mM NaCl. El tamaño de los liposomas es de 100 nm de diámetro..... 179
- Figura 4.11 Variación de la anisotropía, r , para liposomas formados por DPPC (■). Comparación de la variación de temperatura de transición para liposomas modificados por polímero y cargados de DOX (■). Las disoluciones son de disolución tamponada HEPES a pH 7.4..... 180
- Figura 4.12 Coeficientes de difusión para disoluciones de liposomas DOPC:DODAB con un radio medio de 50 nm sin capas (○), con una capa (●) y con cuatro capas (■).Las medidas han sido realizadas a temperatura ambiente, en agua miliQ y en muestras diferentes para cada dilución. La línea roja punteada indica el ajuste de los datos para todos los casos. 181
- Figura 4.13 Obtención del coeficiente de difusión: (a) representa las funciones de correlación de una muestra a diferentes ángulos; (b) representa la función de correlación para varias muestras a 90°; (c) Tiempo d decaimiento a 90° para diferentes muestras; (d) Variación del tiempo de la inversa del tiempo de decaimiento frente al cuadrado del vector de onda para diferentes muestras. Los errores representan las anchuras de las distribuciones de tiempos de relajación. 183
- Figura 4.14 Coeficiente de difusión para vesículas de 100 nm formadas por DOPC:DODAB en una relación 70:30 en disolución salina con 10 mM de NaCl a 25°C a medida que se añade PSS. 184
- Figura 4.15 (a) Potencial zeta o y (b) radio hidrodinámico de una suspensión de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) en función de la concentración del polielectrolito aniónico, PSS. La barra horizontal en (a) indica el error debido al equipo utilizado y que debe tenerse en cuenta a la hora de considerar la densidad de carga positiva o negativa. 185
- Figura 4.16 Radio hidrodinámico frente al potencial zeta para vesículas formadas por fosfolípidos recubiertas con polielectrolitos en disolución salina con una concentración de 10 mM. Las líneas continuas simétricas indican el intervalo inestable de las disoluciones que encierran la zona denominada Potencial de Velegol-Twar. 186
- Figura 4.17 Potencial zeta frente a la concentración de PSS. Las vesículas están formadas por DOPC y DODAB: 10% DODAB (○), 30% DODAB, (○),

- 50% DODAB, (○), 70% DODAB (◐) y 80% DODAB, (◑). Todos los datos corresponden a 25°C y a un volumen total de 2 mL..... 187
- Figura 4.18 Variación de la concentración de polielectrolito aniónico PSS necesaria para alcanzar el punto de neutralización en función del %_m de DODAB en la vesícula. La concentración de las vesículas es constante y la temperatura de medida es 25°C. La recta punteada representa el ajuste lineal de los puntos pasando por cero. 188
- Figura 4.19 Variación de la concentración de polielectrolito catiónico, PAH en función de la carga del liposoma formado por DOPC y DODAB. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: 30:70, (●), 40:60, (◐), 50:50, (◑), 60:40, (◒), 80:20, (◓). Las medidas han sido realizadas en disolución salina 10 mM NaCl y tras centrifugar las muestras y eliminar el complejo inter-polielectrolito..... 189
- Figura 4.20 Variación del potencial zeta en función del número de capas de PSS/PAH adsorbidas sobre los liposomas formados por DOPC y DODAB y medidos a 25°C. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: ● para 30:70, ● para 40:60, ● para 50:50, ● para 60:40, para ● 70:30 y para ● 80:20..... 190
- Figura 4.21 Coeficiente de difusión para vesículas con diferente densidad de carga. Medidas realizadas a 25°C para vesículas de 100 nm de diámetro en disolución salina 10 mM NaCl. Las relaciones DODAB:DOPC representadas son: ● para 30:70, ● para 40:60, ● para 50:50, ● para 60:40, para ● 70:30 y para ● 80:20. 191
- Figura 4.22 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas con 30%_m de DODAB y 70%_m de DOPC..... 192
- Figura 4.24 Crio-TEM de (a) vesícula sin recubrimiento y (b) vesícula con cuatro capas de PSS/PAH en disolución acuosa con una concentración de 10 mM NaCl a pH 7.4. La concentración tanto de la vesícula como de los polielectrolitos es de 1 mg·mL⁻¹..... 193
- Figura 4.23 Crio-TEM de vesículas formadas por DODAB:DOPC (relación 30:70) sin recubrir con una concentración de 1 mg·mL⁻¹..... 193
- Figura 4.25 (a)Vista total de la muestra depositada sobre el portamuestras con crio-SEM a pH 7.4 y de 100 nm de tamaño. (b)Vista de la población total de liposomas en la muestra observada..... 194
- Figura 4.26 Crio-SEM para liposomas de 100 nm donde se observa la tendencia de los liposomas a agregarse con el tiempo. Al mismo tiempo es fácil deducir el tamaño de los liposomas con una gran estadística. (a) y (b) representan la misma zona pero la figura (b) fue tomada con más resolución. 195
- Figura 4.27 Crio-SEM para liposomas de 100 nm y de 1 μm en disolución tampón HEPES regulando el pH a 7.4. Para proteger las muestras, durante el proceso de preparación se cubrieron con 5nm de platino en una cámara en la que se controla que la temperatura se mantenga a la misma que posteriormente se va a medir, que es -196°C..... 195
- Figura 4.28 Focused Ion Beam (FIB) de liposomas de 100nm en disolución tampón HEPES a pH 7.4 y con una fuerza iónica de 10mM. 196

- Figura 4.29 (a) Variación de la intensidad normalizada en función del potencial zeta, ζ , en diferentes tiempos y (b) Variación de la intensidad normalizada con el radio hidrodinámico, R_H , en diferentes tiempos después de la síntesis. Las vesículas estaban formadas por 40%_m DODAB con una capa de PSS en disolución salina 10 mM NaCl. .. 198
- Figura 4.30 (a) Variación de la intensidad normalizada con el potencial zeta, ζ , en diferentes tiempos y (b) Variación de la intensidad normalizada con el radio hidrodinámico, R_H , en diferentes tiempos para vesículas formadas por 40%_m DODAB con cuatro capas del par de polielectrolitos PSS/PAH en disolución salina 10 mM NaCl. 199
- Figura 4.31 Variación del coeficiente de difusión a medida que aumenta la concentración de partículas de látex en la disolución junto a los liposomas sobre los que se adsorbe..... 200
- Figura 4.32 (a) Radio hidrodinámico y (b) potencial zeta de una suspensión de vesículas formadas por DOPC:DODAB (30:70) en función de la concentración de partículas de látex. Se observan claramente las zonas de inversión de carga y de condensación. La zona rayada indica la zona de inestabilidad del sistema donde las medidas no son reproducibles. 201
- Figura 4.33 Potencial zeta en función de la concentración de PSS (●) y de látex (○) sobre liposomas catiónicos formados por 30%_m DODAB. Dependencia del potencial zeta con la concentración de partículas de látex..... 202
- Figura 4.34 Variación del potencial zeta con la concentración de partículas de látex para sistemas formados por liposomas catiónicos con distinta carga iónica. Medidas realizadas en disolución de HEPES 10 mM pH 7.4 a 25°C. Los resultados corresponden a vesículas de DOPC:DODAB (20:80) (□), DOPC:DODAB (70:30) (◻), DOPC:DODAB (90:10) (◻), DOPC:DODAB (95:5) (◻)..... 203
- Figura 4.35 Variación del potencial zeta en función del número de capas para liposomas catiónicos con distinta carga iónica donde la primera capa son partículas de látex. La segunda, tercera y cuarta son capas alternadas de PSS/PAH y finalmente de nuevo otra capa de látex. Las medidas son realizadas en tampón HEPES pH 7.4 a 25°C y las gráficas representadas son para DOPC:DODAB 90:10 (▼), DOPC:DODAB 70:30 (▲), DOPC:DODAB 30:70 (●), DOPC:DODAB 20:80 (■). . 204
- Figura 4.36 Variación de la concentración de látex necesaria para obtener el punto de neutralización con el % de DODAB que forma el sistema de liposomas DOPC:DODAB..... 205
- Figura 4.37 Variación de la intensidad dispersada por liposomas de 100 nm de diámetro con diferentes capas en disolución acuosa con una fuerza iónica de 10 mM NaCl medidos a 25°C. (a) Liposomas catiónicos formados por DOPC:DODAB (50:50) (■) y por (90:10) recubiertos con una capa de partículas de látex de 20 μ m de diámetro (■); (b) DOPC:DODAB (6:4) recubiertos con una capa de poli-estiren sulfonato (PSS) (■) y DOPC:DODAB (50:50) (■). 206
- Figura 4.38 Función de distribución de densidad electrónica en función de la distancia máxima, d_{\max} , calculada a partir de los resultados SAXS para las muestras de liposomas de DOPC con DODAB en disolución acuosa

y 10 mM NaCl donde se muestran: (a) DOPC:DODAB (50:50) (■) y por (90:10) recubiertos con una capa de partículas de látex de 20 μm de diámetro (■); (b) DOPC:DODAB (6:4) recubiertos con una capa de poli-estiren sulfonato (PSS) (■) y DOPC:DODAB (50:50) (■). 207

- Figura 4.39 (a) Variación experimental de la intensidad con respecto al vector de onda. (b) Representación del cuadrado del vector de onda frente al logaritmo de la intensidad por el vector de onda. Aplicación de la ley de Guinier para vesículas DOPC:DODAB (50:50). 208
- Figura 4.40 (a) Densidad electrónica en función de la distancia, r para vesículas DOPC:DODAB (50:50). (b) Representación de $I \cdot q^2$ frente a q 209
- Figura 4.41 Fotografía del patrón de difracción de neutrones para vesículas obtenido con cámara del equipo de SANS en el LLB. Vesículas 30%DODAB-70%DOPC en disolución acuosa con una concentración de 10 mM NaCl. 211
- Figura 4.42 Variación de la intensidad dispersada con el vector de onda en escala logarítmica. Resultados de neutrones para vesículas sin recubrimiento (■) y vesículas con dos bicapas (□). 213
- Figura 4.43 (a) Variación de la Intensidad dispersada por neutrones por el vector de onda en función del cuadrado del vector de onda, $\ln[I(q)] \cdot q$ frente a q^2 (b) Misma representación pero en el intervalo seleccionado, en el que se aplica la Ley de Guinier y obtener el radio de giro en vesículas recubiertas con (Látex/PAH). 214
- Figura 4.44 (a) Imagen de FIB de partículas de poliestireno de 3 μm recubiertas con liposomas de 100 nm. La adsorción de los liposomas sobre estas partículas se ha realizado mediante la técnica capa a capa por interacciones electrostáticas. (b) Corte del sistema obtenido con FIB. 216
- Figura 4.45 CLSM: Partículas de látex recubiertas de liposomas de 1 μm con *Quantum Dots* en la bicapa lipídica. 217
- Figura 4.46 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas catiónicas DOPC:DODAB (70:30) en tampón HEPES pH 7.4 medidas a 25°C. 218
- Figura 4.47 Variación del potencial zeta para vesículas formadas por DODAB en relación a DOPC (3:1) recubiertas con el par de polielctrolitos PGA/PLL en disolución tampón a pH 7.4. 219
- Figura 4.48 Evolución del radio hidrodinámico en función del número de capas para vesículas zwitteriónicas formadas por DOPC en tampón HEPES pH 7.4 medidas a 25°C. 220
- Figura 4.49 (a) Variación del potencial con la concentración de PLL añadido a la disolución tamponada a pH 7.4 de liposomas formados por DOPC y (b) Variación del potencial con la concentración de PGA añadido a la disolución tamponada a pH 7.4 de liposomas formados por DOPC. 221
- Figura 4.50 (a) Recubrimiento de DOPC con PEI en disolución tamponada a pH 7.4. (b) Recubrimiento con PGA tras PEI para DOPC en disolución tamponada a pH 7.4. 222

- Figura 4.51 Evolución del potencial zeta en función del número de capas para liposomas zwiteriónicos como el formado por DOPC para sistemas con los pares polielectrolitos PLL/PGA (●) y PEI/PGA/PLL (○).... 222
- Figura 4.52 Variación del radio hidrodinámico en función de la temperatura para liposomas formados por DMPC y de tamaño 100 nm. 223
- Figura 4.53 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para todos los sistemas liposomares formados por DMPC y DMPE-PEG medidos en disolución tamponada con una fuerza iónica igual a 10mM y pH7.4 donde (■) son liposomas formados por DMPC puro, (●) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₁₀₀₀ (96:4), (○) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₁₀₀₀ (92:8), (▲) son los formados por DMPC:DMPE_PEG₅₀₀₀ (96:4), y finalmente (△) que son los formados por DMPC:DMPE_PEG₅₀₀₀ (92:8). 224
- Figura 4.54 Variación del potencial zeta con el pH para liposomas zwiteriónicos formados por DMPC, y DMPC:DMPE_PEG. Las cadenas de PEG estudiadas son dos, con distinto peso molecular, por lo que se estudiaron dos ratios para cada uno de los PEG utilizados que permitan ser separados. 225
- Figura 4.55 (a) Variación del potencial zeta con el pH para liposomas formados por DMPC:DMPE_PEG₁₀₀₀ (98:2) en disolución tamponada a pH 7.4 y medido a temperatura ambiente, 25°C. (b) Variación del potencial zeta (■) y del radio hidrodinámico (■) con la temperatura cuando el liposoma formado por DMPC:DMPE-PEG₁₀₀₀ (98:2) encapsula la enzima en su interior. 227
- Figura 4.56 (a) Absorbancia frente a longitud de onda para la nitrocefina. (b) Absorbancia frente a longitud de onda para los liposomas obtenidos de DMPC y un 1.7% de PEG₁₀₀₀ con β-lactamasa en su interior. 227
- Figura 4.57 (a) Variación del espectro de absorción a medida que transcurre la reacción. El subíndice 0 indica el tiempo antes de añadir el sustrato y cada una de las medidas posteriores se realizaron cada cinco minutos una vez añadido el sustrato y agitado la mezcla.. (b) Espectro obtenido después de añadir TRITON-X100 medido a temperatura ambiente, 25°C. En la disolución está la enzima, el sustrato, el surfactante y la disolución de liposomas DMPC:DMPE_PEG. 228
- Figura 4.58 Representación de la variación de la absorbancia frente al tiempo. 229
- Figura 4.59 Variación del punto isoeléctrico para liposomas formados por DPPC en función del tipo de compuesto añadido en la bicapa o en el interior de los liposomas. Las medias han sido realizadas a temperatura ambiente y en disolución acuosa con una fuerza iónica igual a 10mM para todas las muestras. 231
- Figura 4.60 Imagen de Crio-SEM para liposomas de 1 μm a pH 7.4 en disolución tampón HEPES. La medida de los huecos que dejan las vesículas y cambiar su posición. El tamaño estimado es de 917.5±92.5 nm. 232
- Figura 4.61 Crio-SEM con liposomas de 1 μm como control y liposomas recubiertos con polímero mediante la técnica capa a capa a pH 7.4 en disolución tampón HEPES. La medida de las vesículas es 917.5±92.5 nm. 233

- Figura 4.62 Crio-SEM con liposomas de 1 μm como control y liposomas recubiertos con polímero en la bicapa lipídica extruidos con membrana de tamaño de poro idéntico a pH 7.4 en tampón HEPES..... 234
- Figura 4.63 Adsorción de liposoma unilamelar sobre una superficie hidrofílica^[22]. Se han observado tres pasos desde que se pone en contacto la disolución de liposomas con el sustrato hasta que se forma la bicapa de lípidos y se comentan en el texto. 235
- Figura 4.64 Adsorción de vesículas catiónicas sobre diferentes sustratos antes del lavado con disolución salina con la misma fuerza iónica. Ambas disolución tienen una fuerza iónica de 10 mM NaCl y las medidas se hicieron a 25°C. 236
- Figura 4.65 Secuencia de adsorción para (PSS+PAH) sobre una vesícula de DOPC+DODAB (70:30) adsorbida sobre un sustrato plano. La línea continua representa la variación de frecuencia, Δf , normalizada por el número de armónico, ν , para el tercer armónico, $(\Delta f / \nu)_{3\text{rd}}$, y la línea discontinua indica la variación de disipación para el mismo armónico, ΔD . Las flechas indican la inyección del material que se adsorbe y los procesos de lavado, flechas continuas para inyección de material y flechas discontinuas para la introducción de las disoluciones de lavado. 238
- Figura 4.66 Dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $-(\Delta f / \nu)$. La figura del interior muestra la dependencia en N de la variación del factor de disipación para el tercer armónico, ΔD 239
- Figura 4.67 (a) Dependencia con el número de capas, N , de los espesores acústico, h_{ac} , y el espesor óptico, h_{op} , obtenido por el análisis de los datos de los experimentos realizados usando D-QCM y elipsometría, respectivamente. (b) Dependencia con el número de capas, N , del contenido en agua, X_w , de la multicapas obtenido por la comparación de los datos obtenidos usando D-QCM y elipsometría, respectivamente. 240
- Figura 4.68 Representación ΔD vs. $-(\Delta f / \nu)$ para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC:DODAB (70:30) sobre sustrato plano y con capas sucesivas de partículas de látex y el par de polielectrolitos PSS/PAH en disolución con 10 mM NaCl. 242
- Figura 4.69 Dependencia con el número de capas, N , de las componentes del módulo de cizalla, G' y G'' para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC:DODAB sobre sustrato plano y con capas de polielectrolitos PSS/PAH con la penúltima capa adsorbida sobre los liposomas de partículas de látex en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl. 243
- Figura 4.70 Secuencia de adsorción para PEI(PGA+PLL) sobre una vesícula de DOPC adsorbida sobre un sustrato plano. La línea continua representa la variación de frecuencia, Δf , normalizada por el número de armónico, ν , para el tercer armónico, $(\Delta f / \nu)_{3\text{rd}}$, y la línea discontinua indica la variación de disipación para el mismo armónico, ΔD . Las flechas indican la inyección del material que se adsorbe y los procesos de lavado, flechas continuas para inyección de material y

	flechas discontinuas para la introducción de las disoluciones de lavado.	244
Figura 4.71	Dependencia con el número de capas, N , de la variación de frecuencia para los distintos armónicos del cristal de cuarzo, $-(\Delta f/\nu)$. La figura insertada muestra la dependencia en N de la variación del factor de disipación para el tercer armónico, ΔD	245
Figura 4.72	(a) Dependencia con el número de capas, N , de los espesores acústico, h_{ac} , y el espesor óptico, h_{op} , obtenido por el análisis de los datos de los experimentos realizados usando D-QCM y elipsometría, respectivamente. (b) Dependencia con el número de capas, N , del contenido en agua, X_w , de la multicapas obtenido por la comparación de los datos obtenidos usando D-QCM y elipsometría, respectivamente.	246
Figura 4.73	Representación ΔD vs. $-(\Delta f/\nu)$ para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC sobre sustrato plano y con capas sucesivas del par de polielectrolitos PGA/PLL con una capa inicial adsorbida sobre los liposomas de PEI en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl.	247
Figura 4.74	Dependencia con el número de capas, N , de las componentes del módulo de cizalla, G' y G'' para el sistema formado por vesículas formadas por DOPC sobre sustrato plano y con capas de polielectrolitos PGA/PLL con una capa inicial adsorbida sobre los liposomas de PEI en disolución tamponada a pH 7.4 con 10 mM NaCl.	248
Figura 4.75	Variación del espesor con el número de capas mediante Dispersión de luz (●), Balanza de cuarzo, (●) y Elipsometría, (●), para los sistemas formados por (DOPC:DODAB)-(PSS/PAH)-Latex-PAH, (a), y DOPC-PEI-(PGA/PLL) ₂ , (b).	249
Figura 4.76	Comparativa de la liberación de DEX marcado con FITC en liposomas zwitteriónicos de DPPC de 1 μm a pH 7.4. Se observa la cantidad de fármaco liberado para liposomas con polímero en la bicapa y para liposomas con una capa adicional de PEG ensamblado mediante la técnica denominada <i>pegylation post-coating</i>	251
Figura 4.77	Comparativa de la liberación de DOX marcado con FITC en liposomas zwitteriónicos DPPC de 1 μm a pH 7.4. Se observa la cantidad de fármaco liberado para liposomas con polímero en la bicapa y para liposomas con además una capa de PEG ensamblado mediante la técnica denominada <i>pegylation post-coating</i>	252
Figura 4.78	Aspecto del microgel sintetizado denominado p-(NIPAM)-co-VI... ..	254
Figura 4.79	Variación del radio hidrodinámico del p-(NIPAM)-co-VI sin recubrir en función de la temperatura en disolución acuosa a diferentes pH: pH 3.3 (▲), pH 8.5 (■) y pH 9.2 (●). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento.	255
Figura 4.80	Variación del radio hidrodinámico del microgel p-(NIPAM)-co-VI con la temperatura a diferentes valores de fuerza iónica: sin adición de sal (□), con 0.1 M NaCl (○), con 0.25 M NaCl (◇) y con disolución tampón y 0.15 M NaCl (Δ).	256

- Figura 4.81 Ilustración de la respuesta que muestra un microgel recubierto con diferentes polielectrolitos al aumentar la temperatura^[390] 257
- Figura 4.82 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina}-(PSS/PDADMAC). El microgel en agua miliQ y los polielectrolitos disueltos en 0.1M NaCl sin recubrimiento (■□), con una capa de polielectrolito (○●) y tres capas de polielectrolitos (▲▲). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Las flechas grises muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas..... 258
- Figura 4.83 Variación del radio hidrodinámico con la temperatura para el microgel p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina}-(PSS/PDADMAC). El microgel está en agua miliQ y los polielectrolitos disueltos con una fuerza iónica de 0.25 M NaCl sin recubrimiento (■□), con la primera capa de polielectrolito (●○) y segunda capa de polielectrolitos (▼), cuarta capa (▲▲), quinta capa (◆◆), seis capas (◀). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Las flechas grises muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas. 259
- Figura 4.84 Temperatura de transición para p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en H₂O y recubierto con los polielectrolitos (PSS/PDADMAC) en 0.25M NaCl y a 20°C. 260
- Figura 4.85 Variación del radio hidrodinámico con la temeperatura del sistema p-(NIPAM)-co-VI_(Rodamina)-(PLL/PGA)_n. El microgel está en agua y los polielectrolitos en disolución tampón a pH 7.4 y con 0.15M NaCl. Las flechas azules muestran la tendencia lineal, el crecimiento, de las multicapas..... 264
- Figura 4.86 (a) Variación de la movilidad electroforética con la temperatura para el microgel de carga positiva p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.1M NaCl donde los símbolos (■□) representan al microgel sin recubrimiento, con la primera capa de polielectrolito (●○), segunda capa de polielectrolitos (▼), cuarta capa (▲▲), quinta capa (◆◆). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. (b) Variación de la movilidad electroforética en función del número de capas que recubren el microgel donde (■) indica la movilidad electroforética medida a 25°C y (□) la movilidad electroforética medida a 44°C despues de la temperatura de colapso. 265
- Figura 4.87 (a) Variación de la movilidad electroforética con la temperatura para el microgel p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.25 M NaCl sin recubrimiento y con diferente número de capas donde los símbolos (■□) representan al microgel sin recubrimiento, con la primera capa de polielectrolito (●○), segunda capa de polielectrolitos (▼), cuarta capa (▲▲), quinta capa (◆◆). Los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. Variación de la movilidad electroforética en función del número de capas que recubren el microgel donde (■) indica la movilidad electroforética medida a 25°C y (○) la movilidad electroforética medida a 44°C despues de la temperatura de colapso. 266
- Figura 4.88 Variación de la movilidad electroforética con el número de capas de polielectrolitos para el microgel de carga positiva p-(NIPAM)-co-VI_{Rodamina} en 0.1M NaCl, 0.25M NaCl. Temperatura medida 25°C.. 267

- Figura 4.89 Variación de la movilidad electroforética con el número de capas de polielectrolitos para p-(NIPAM)-co-VI con el par de polielectrolitos PGA/PLL en disolución tamponada a pH 7.4 y medido a 25°C,(■), y a 44°C,(○), despues de la temperatura de colapso. 268
- Figura 4.90 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución con fuerza iónica 0.1M NaCl. Estabilidad temporal del microgel recubierto por la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. 269
- Figura 4.91 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución acuosa con fuerza iónica 0.25M NaCl. Estabilidad temporal del microgel recubierto por la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. 270
- Figura 4.92 Variación del tamaño a medida que aumenta la temperatura para el recubrimiento del microgel en disolución con fuerza iónica de 0.15M NaCl y tamponado a pH 7.4. Estabilidad temporal del microgel recubierto mediante la técnica capa a capa donde los símbolos rellenos indican calentamiento y los símbolos huecos indican enfriamiento. 271
- Figura 4.93 Método de obtención de los híbridos donde (1) preparación de partícula de sílice a pH 7, (2) adsorción de nanocápsulas poliméricas por interacciones electrostáticas, (3) capas de protección, se distinguen tres casos: PLL, PLL/PMA_c o PVP/PMA_c (4) adsorción de liposomas (5) capa de protección, PMA_c, (5.a) disposición de los polímeros si es el caso de dos capas de protección formadas por cadenas laterales de colesterol, (5.a.1) vista de cerca de la estructura que adoptan las cadenas de colesterol entre las cadenas de lípido (6) Adsorción capa a capa de los pares de polielectrolitos PMA_{SH}/PVP y entrecruzamiento con BM(PEG)₂ (7) Vaciado de la partícula dando lugar a los híbridos..... 273
- Figura 4.94 Entrecruzamiento realizado para dar lugar a enlaces disulfuro que proporciona al híbrido formado mayor estabilidad. 274
- Figura 4.95 Resultados del citómetro de flujo tras introducir la muestra y fijar los parámetros estudiados en estos sistemas previamente. 275
- Figura 4.96 (a) Intensidad de fluorescencia en láser rojo tras el ensamblamiento de las cápsulas de 300 nm y (b) en láser verde, tras el ensamblamiento de los liposomas DMPC:DPPC (40:10); Las medidas se realizaron a 25°C y un volumen de 2 mL..... 276
- Figura 4.97 (a) Intensidad de fluorescencia en rojo tras el ensamblamiento de las cápsulas de 300 nm y (b) en láser verde, tras el ensamblamiento de los liposomas DOPC:DODAB (30:70); Las medidas se realizaron a 25°C y un volumen de 2 mL..... 277
- Figura 4.98 Intensidad de la fluorescencia con láser rojo, tras el ensamblamiento de las capsulas de 300 nm; Las medidas se realizaron a 25°C y con el mismo volumen total medido igual a 2 mL. La primera columna de la izquierda (más oscura) corresponde a la medida después de adsorberse las cápsulas de 300 nm; la segunda columna al momento en que se forma el *core-shell* a pH 4, la tercera columna es el híbrido tras el tratamiento ácido para disolver la partícula de sílice a pH 4 y la última

- columna (color blanco) corresponde al híbrido tras el tratamiento ácido pero a pH 7.4. 278
- Figura 4.99 Intensidad de la fluorescencia con láser verde, tras el ensamblamiento de los liposomas. Medidas realizadas a 25°C y en un volumen de muestra igual a 2 mL. La primera columna de la izquierda (más oscura) corresponde a la medida después de adsorberse los liposomas; la segunda columna al momento en que se forma el *core-shell* a pH 4, la tercera columna es el híbrido tras el tratamiento ácido para disolver la partícula de sílice a pH 4 y la última columna (color blanco) corresponde al híbrido tras el tratamiento ácido pero a pH 7.4. 279
- Figura 4.100 Isotermas a T= 25°C para distintas combinaciones medidas tras realizar la adsorción de los liposomas. Indica el tiempo necesario para que se asegure la adsorción completa de los liposomas sobre la superficie. Se ha añadido la isoterma para liposomas insaturados catiónicos para mostrar todos los casos estudiados. 281
- Figura 4.101 Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste en las que inicialmente se observa la adsorción de las cápsulas poliméricas y tras adsorber dos capas de polímeros, una de ellas con las cadenas de colesterol se adsorben los liposomas de 50 nm de diámetro. Todo este proceso se desarrolla a pH 4 en disolución tamponada. 282
- Figura 4.103 Imagen de Confocal de los híbridos con la primera capa de nanocápsulas poliméricas de PVP/PMA_{SH} (en rojo) y otra capa, tras varios polímeros sin sonda, de liposomas con NBD en la bicapa de los liposomas. Imágenes obtenidas a pH 7.4 en disolución tampón de HEPES 150 mM con una concentración de 10 mM NaCl. La temperatura de medida fue de 25°C. 283
- Figura 4.102 Imagen obtenida mediante microscopía de contraste, campo claro que muestra el paso de híbridos en forma de *core-shell* a cápsulas por el tratamiento ácido tamponado y tras el lavado con disolución tampón a pH 7. 283
- Figura 4.104 Imagen obtenida mediante CLSM de los híbridos que contienen como primera capa, adsorbida electrostáticamente, las nanocápsulas poliméricas de PMA_{SH}/PVP marcadas con Alexa-Fluor-633 y con otra capa, posterior a esta y tras dos capas de sacrificio, los liposomas de 50 nm de diámetro marcados con el fluoróforo NBD. Estas imágenes de los híbridos fueron tomadas en disolución tampón a pH 4. 284
- Figura 4.105 Imagen obtenida mediante Microscopía de contraste (DIC) de híbridos invertidos, conteniendo en primer lugar los liposomas marcados con el fluoróforo NBD y como capa más externa, las nanocápsulas poliméricas de PMA_{SH}/PVP marcadas con Alexa-Fluor-633 y todo ello en disolución tampón a pH 7 en la etapa de *core-shell*. Se muestran formas esféricas y partículas no agregadas. 285
- Figura 4.106 Imágenes obtenidas por microscopía de transmisión electrónica (TEM) de una cápsula polimérica con liposomas y nanocápsulas poliméricas alrededor a un pH 7.4. La escala es de 1 µm. 286
- Figura 4.107 Representación de la absorbancia a 492 nm frente al tiempo que corresponde a la longitud de onda a la que el producto de la reacción enzimática absorbe. Un control negativo es aquel en el que los liposomas están en disolución con el surfactante pero no poseen en el

interior la enzima y otro control negativo que corresponde a liposomas con la enzima pero sin la presencia del surfactante. En la centro de la gráfica se observa (a) que es la muestra control de liposomas con enzima en presencia del sustrato sin Tritón X-100, (b) es la muestra sin enzima, en presencia del sustrato al que se le añade Tritón X-100 y (c) la muestra con liposomas con enzima encapsulada que lo liberan al añadir Tritón X-100 dando lugar al cambio de color a rojo y al aumento de absorbancia. 289

Figura 4.108 Intensidad de fluorescencia en función del tiempo para el proceso de degradación de las cápsulas de 300 nm formadas por PMA_{SH} y PVP en pH 7.4, donde se muestra el máximo de intensidad tras su degradación (■) y los datos de la muestra control que es la disolución de híbridos sin la presencia de GSH(○). 290

Figura 4.109 Micrografías obtenidas con cámara en blanco y negro de los híbridos antes y después de la reacción con GSH como prueba de la desorción de las nanocápsulas del complejo completo híbrido. Imágenes de arriba fueron tomadas sin excitar la fluorescencia de las nanocápsulas de 300 nm y las imágenes de abajo se tomaron excitando el fluorocromo que poseen dichas nanocápsulas. 291

9.3 LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1	Geometría de los agregados frente al parámetro de empaquetamiento P_c	26
Tabla 1.2	Nombres y estructuras de algunas cabezas polares más utilizadas	48
Tabla 2.1	Posiciones posibles de los polarizadores.....	112
Tabla 3.1	Características principales de los lípidos usados.	137
Tabla 3.2	Polielectrolitos independientes del pH.	139
Tabla 3.3	Polielectrolitos dependientes del pH.	140
Tabla 3.5	Polímeros comerciales de Sigma-Aldrich derivado del p-(NIPAM) con cadenas terminales de -COOH y derivado del polietilenglicol.	141
Tabla 3.4	Reactivos necesarios para la fabricación de PMA _{SH}	141
Tabla 3.6	Descripción detallada de los reactivos necesarios para la fabricación del microgel p-(NIPAM)-co-VI.....	142
Tabla 3.7	Otros materiales utilizados en los experimentos:.....	146
Tabla 3.8	Características de los tampones utilizados.....	148
Tabla 3.9	Volúmenes para la preparación de la recta patrón	154
Tabla 4.1	Radio hidrodinámico obtenido al extruir la disolución de vesículas y utilizando una membrana de tamaño de poro de 100 nm.....	171
Tabla 4.2	Coefficiente de difusión a dilución infinita para el sistema de liposomas DOPC:DODAB (30:70).....	182
Tabla 4.3	Radio de giro, Diámetro máximo e Intensidad inicial para muestras de liposomas en disolución acuosa con fuerza iónica de 10mM NaCl. ..	208
Tabla 4.4	Radio obtenidos experimentalmente mediante dispersión de rayos X para liposomas con diferentes recubrimientos a 20°C.....	210
Tabla 4.5	Datos principales de los compuestos utilizados en SANS	212
Tabla 4.6	Radio obtenidos para liposomas con diferentes recubrimientos	214
Tabla 4.7	Radio obtenidos experimentalmente para liposomas con diferentes recubrimientos aplicando la Ley de Guinier.....	215
Tabla 4.8	Radio obtenidos experimentalmente para liposomas con diferentes recubrimientos utilizando distintas técnicas	215
Tabla 4.9	Valores del punto isoeléctrico para liposomas de 100 nm en disolución salina de 10 mM formado por DMPC y DMPE modificado con cadenas de PEG de distinto peso molecular	226

Tabla 4.10	Valores del PDI para liposomas de 100 nm en disolución salina de 10 mM formado por DMPC y DMPE modificado con cadenas de PEG de distinto peso molecular	230
Tabla 4.11	pH medido antes y después del ciclo de centrifugación medidos a 20°C.....	262
Tabla 4.12	pH medido antes y después del ciclo de centrifugación medidos a temperatura ambiente, 20°C y a la mayor fuerza iónica.	263

